

**Identifizierung von
Phosphorylcholin-bindenden
Proteinen aus *Caenorhabditis elegans***

Inauguraldissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
des Fachbereichs Medizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von
Ann-Christin Bakker
aus Thuine

Gießen 2011

Aus dem Biochemischen Institut des Fachbereichs Medizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Leiter: Prof. Dr. Klaus T. Preissner

Gutachter: PD Dr. Günter Lochnit

Gutachter: Prof. Dr. Jürgen Lohmeyer

Tag der Disputation: 24.01.2012

Erklärung

„Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbstständig, ohne unerlaubte Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe.

Alle Textstellen, die wörtlich und sinngemäß aus veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht.

Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.“

INHALTSVERZEICHNIS

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

TABELLENVERZEICHNIS

1 EINLEITUNG	1
1.1 FREILEBENDE NEMATODEN	1
1.2 POSTTRANSLATIONALE MODIFIKATION MIT PHOSPHORYLCHOLIN (PC)	3
1.3 PARASITÄRE NEMATODEN	5
1.4 MEDIZINISCHER STATUS-QUO UND THERAPIE DER ONCHOZERKOSE	8
1.5 IMMUNMODULATION DURCH PARASITÄRE NEMATODEN	10
1.6 ZIEL DER ARBEIT	15
2 MATERIAL UND METHODEN	16
2.1 GERÄTE UND CHEMIKALIEN	16
2.2 KULTIVIERUNG VON <i>C. ELEGANS</i>	16
2.2.1 Kultivierung auf Agarplatten	16
2.2.2 Kultivierung mit hühnereihaltigem Nährboden	17
2.3 AUFREINIGUNG VON <i>C. ELEGANS</i>	17
2.4 PROTEINEXTRAKTION	18
2.5 PROTEINBESTIMMUNG	19
2.6 AFFINITÄTSCHROMATOGRAPHIE	20
2.6.1 Vorbereitung	20
2.6.2 Durchführung	20
2.7 FÄLLUNGEN	21
2.7.1 Vorbereitung	21
2.7.2 Aceton-Fällung	22
2.7.3 Methanol-Chloroform-Fällung	22
2.8 EINDIMENSIONALE GELELEKTROPHORESE	23
2.8.1 Entsalzung durch Gelfiltration	23
2.8.2 1D-SDS-Gelelektrophorese	23
2.8.3 Native Gelelektrophorese	25
2.9 ZWEIDIMENSIONALE GELELEKTROPHORESE	26
2.10 PROTEINFÄRBUNG	33
2.10.1 Proteinfärbung mit Commassie	33
2.10.2 Massenspektrometrie (MS)-kompatible Silberfärbung	33
2.11 TRYPTISCHER VERDAU VON PROTEINEN IM GEL	34
2.12 MASSENSPEKTROMETRIE	35

2.12.1 MALDI-TOF-MS (Matrix-assisted-Laser-Desorption/ Ionization-Time-of-Flight-Mass-Spektrometry).....	36
2.12.2 ESI-MS (Elektrospray-Ionization-Mass-Spektrometry)	38
3 ERGEBNISSE	40
3.1 OPTIMIERUNG UND ETABLIERUNG DER EXTRAKTIONS-UND PROBENVORBEREITUNG.....	42
3.1.1 Optimierung der <i>C. elegans</i> - Extraktion	42
3.1.2 Optimierung der Fällung des <i>C. elegans</i> - Materials	45
3.1.3 Optimierung der isoelektrischen Fokussierung	47
3.1.4 Optimierung der Färbung der Gele	49
3.2 ETABLIERUNG DER AFFINITÄTSCHROMATOGRAPHIE	50
3.2.1 Affinitätschromatographie mit CRP	50
3.2.2 Affinitätschromatographie mit TEPC-15	54
3.2.3 Optimierung der Affinitätschromatographie mit <i>C. elegans</i> -Material	57
3.2.4 Isolierung von PC-bindenden Proteinen aus <i>C. elegans</i> durch Affinitätschromatographie.....	58
3.3 PROTEINIDENTIFIKATION	58
3.3.1 Identifikation von PC-bindenden Proteinen aus <i>C. elegans</i> mittels MALDI-TOF- MS.....	58
3.3.2 Identifikation von PC-bindenden Proteinen aus <i>C. elegans</i> mittels ESI-MS	66
4 DISKUSSION	70
5 ZUSAMMENFASSUNG	80
6 SUMMARY	81
7 LITERATUR	85
LEBENS LAUF	
DANKSAGUNG	

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

<i>A. suum</i>	<i>Ascaris suum</i>
ATP	Adenosintriphosphat
<i>B. malayi</i>	<i>Brugia malayi</i>
CBM	Choline-binding-site
<i>C. elegans</i>	<i>Caenorhabditis elegans</i>
CHAPS	3-((3-Cholamidopropyl)dimethylammonio)-1-propansulfonsäure
CTP	Cytidin-5'-triphosphat
DCC	Dosage compensation complex
DTT	Dithiothreitol
ES	Exkretorisch-sekretorische Produkte
ESI	Elektrospray-Ionisation
GPELF	Global Programme to Eliminate Lymphatic Filariasis
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
IEF	Isoelektrische Fokussierung
Maldi-TOF	Matrix-assisted laser-desorption ionization time-of-flight
MDA	Mass Drug Administration
MS	Massenspektrometrie
<i>L. sigmodontis</i>	<i>Litomosoides sigmodontis</i>
OCP	Onchocerciasis Control Programme
OEPA	Onchocerciasis Elimination Program of the Americas
<i>O. volvulus</i>	<i>Onchocerca volvulus</i>
PAF	Plättchenaktivierender Faktor
SDS-Page	Natriumdodecylsulfat/Polyacrylamid Gelelektrophorese
TEMED	N, N, N, N-Tetramethylethylendiamin
TFA	Trifluoressigsäure
Tris	Trishydroxymethylaminoethan
VEGF	Vaskular Endothelial Growth Factor
WHO	World Health Organisation

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1	Fotographie eines adulten Hermaphroditen.....	2
Abbildung 2	Schema eines adulten Hermaphroditen.....	2
Abbildung 3	Der Lebenszyklus von <i>C. elegans</i>	2
Abbildung 4	Systemische Einordnung der Nematoden <i>C. elegans</i> und <i>O. volvulus</i>	3
Abbildung 5	Struktur von PC.....	3
Abbildung 6	Biosynthetische Wege des Cholin-Metabolismus.....	5
Abbildung 7	Geographische Verbreitung der Onchozerkose in Afrika, Kleinasien, Zentral- sowie nördliches Südamerika.....	6
Abbildung 8	Sklerosierende Keratitis bei Onchozerkose.....	7
Abbildung 9	Publizierte PC-substituierte N-Glykan-Strukturen von <i>A. viteae</i> (A), <i>C. elegans</i> (B), <i>T. spiralis</i> (C), <i>O. volvulus</i> und <i>O. gibsoni</i> (D).....	12
Abbildung 10	Vorkommen PC-haltiger Glykosphingolipide der Arthroserie.....	13
Abbildung 11	Schematische Darstellung des MALDI-Prozesses.....	36
Abbildung 12	Schematische Darstellung eines MALDI-TOF-Massenspektrometers.....	37
Abbildung 13	Schematische Darstellung der Elektro-Spray-Ionisation.....	38
Abbildung 14	Schema zur Identifizierung von Proteinen von PC-bindenden Proteinen.....	40
Abbildung 15	Silbergefärbtes 1D-SDS-PAGE-Gel der Rohextrakte und Eluate der Affinitätschromatographie von <i>C. elegans</i> in drei verschiedenen Extraktionen.....	42
Abbildung 16	2D-Gel der Eluate der Affinitätschromatographie von <i>C. elegans</i> nach Extraktion mit Tris-Lysispuffer und Silberfärbung.....	43
Abbildung 17	2D-Gel der Eluates der Affinitätschromatographie von <i>C. elegans</i> nach Extraktion mit Lysispuffer mit CHAPS und Silberfärbung.....	44
Abbildung 18	2D-Gel der Eluates der Affinitätschromatographie von <i>C. elegans</i> nach Extraktion mit Lysispuffer ohne CHAPS und Silberfärbung.....	44

Abbildung 19 Auftrennung der <i>C. elegans</i> -Proteine nach Methanol-Chloroformfällung durch 2D-Gelelektrophorese.....	46
Abbildung 20 Auftrennung der <i>C. elegans</i> -Proteine nach Aceton-Fällung durch 2D-Gelelektrophorese.....	47
Abbildung 21 Trennung der <i>C. elegans</i> -Proteine des Eluatmaterials auf kommerziellen IPG-Strips und 2D-Gelelektrophorese.....	48
Abbildung 22 Trennung der <i>C. elegans</i> -Proteine des Eluatmaterials auf selbsthergestellten IEF-Strips und 2D-Gelelektrophorese.....	49
Abbildung 23 1D-Gradientengel des CRP-Ausgangsmaterials und des Eluats der Affinitätschromatographie.....	51
Abbildung 24 Identifizierung von CRP im Ausgangsmaterial.....	52
Abbildung 25 Identifizierung von CRP im Eluat.....	54
Abbildung 26 1D-Gel des Eluates der Affinitätschromatographie von TEPC-15 nach Silberfärbung.....	56
Abbildung 27 Identifizierung des Antikörpers TEPC-15 im Eluat der Affinitätschromatographie.....	56
Abbildung 28 Proteinbestimmung nach Elutionszeiten von 15 min und 30 min.....	58
Abbildung 29 Durch MALDI-TOF-MS identifizierte PC-bindende Proteine von <i>C. elegans</i>	60
Abbildung 30 Analysierte Spots im Eluat-Gel von <i>C. elegans</i>	61
Abbildung 31 Identifizierte PC-bindende Proteine von <i>C. elegans</i>	62
Abbildung 32 Spektrum des Spots-Nr.9 und Identifizierung des PC-bindenden Proteins.....	64
Abbildung 33 Spektrum von Spot Nr.80 und Identifizierung des PC-bindenden Proteins.....	65
Abbildung 34 Spektrum des Spots-Nr. 46 und Identifizierung des PC-bindenden Proteins..	67
Abbildung 35 Durch ESI-MS identifizierte PC-bindende Proteine von <i>C. elegans</i>	69

TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1	Identifizierte PC-bindende Proteine von <i>C. elegans</i> nach MALDI-MS.....	67
Tabelle 2	Identifizierte PC-bindenden Proteine von <i>C. elegans</i> nach ESI-MS.....	69

1 EINLEITUNG

1.1 Freilebende Nematoden

Nematoden (griech.: „nema“=Faden) sind Rund-oder Fadenwürmer (Filarien), die zum Stamm der Helminthen gezählt werden. Sie gehören zu den artenreichsten Stämmen des Tierreichs und werden derzeit mit über 20.000 verschiedenen Arten beschrieben.

Nematoden findet man in fast allen Lebensräumen dieser Welt, denn sie besiedeln das Meer, das Süßwasser und die feuchte Erde. Unter den Nematoden findet man sowohl freilebende Arten, wie den Modellorganismus *Caenorhabditis elegans* als auch parasitäre Arten, wie z.B. den Erreger der Flussblindheit *Onchocerca volvulus* [1], s. 1.3). *C. elegans* wurde im Jahre 1960 durch den Entwicklungsbiologen Sydney Brenner als Beobachtungsobjekt für die Zellbiologie und die Entwicklungsbiologie in die Wissenschaft eingeführt [2]. Seitdem ist die medizinische Bedeutung an *C. elegans* als Modellsystem stetig gewachsen. Seine Transparenz (s. Abb. 1), der einfache morphologische Aufbau (s. Abb. 2), der schnelle Lebenszyklus (s. Abb. 3), seine konstante Zellzahl sowie das vollständig sequenzierte Genom mit ca. 9×10^7 Basenpaaren auf ca. 20.000 proteincodierenden Genen machen ihn zu einem beliebten Modellorganismus für die Entwicklungsbiologie, die Zellbiologie und die Neurobiologie. Darüber hinaus ist er leicht kultivierbar und hat eine hohe Reproduktionsrate. Sein Zellstammbaum und seine neuronalen Verschaltungen sind heute lückenlos aufgeschlüsselt und durch jahrelange Arbeit ist es gelungen, die vollständige Embryonal- und Larvenentwicklung vom Ei bis zum adulten Tier auf zellulärer Ebene zu beschreiben. Durch ihn als Stellvertreter der Nematoden konnten wertvolle Erkenntnisse über Infektionsmechanismen und darüber hinaus therapeutische Ansatzpunkte zur Etablierung neuer Medikamente mit antihelminthischem Potential gegen Nematodenerkrankungen gefunden werden [3-4].

Hilfreich war dabei der hohe Grad der Übereinstimmung von Anatomie und Entwicklung sowie die nahe Verwandtschaft zu parasitischen Nematoden wie *O. volvulus* (s. Abb. 4).

Eine Zusammenfassung dieser Daten für die Modellorganismen *C. elegans* und *Caenorhabditis briggsae* existiert in der WormBase Datenbank [5].

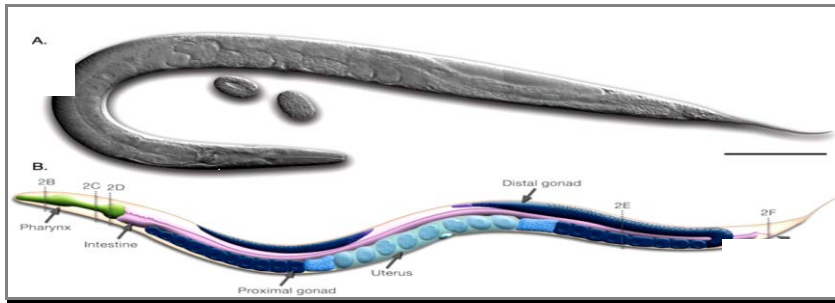


Abbildung 1 Fotografie eines adulten Hermaphroditen [6]

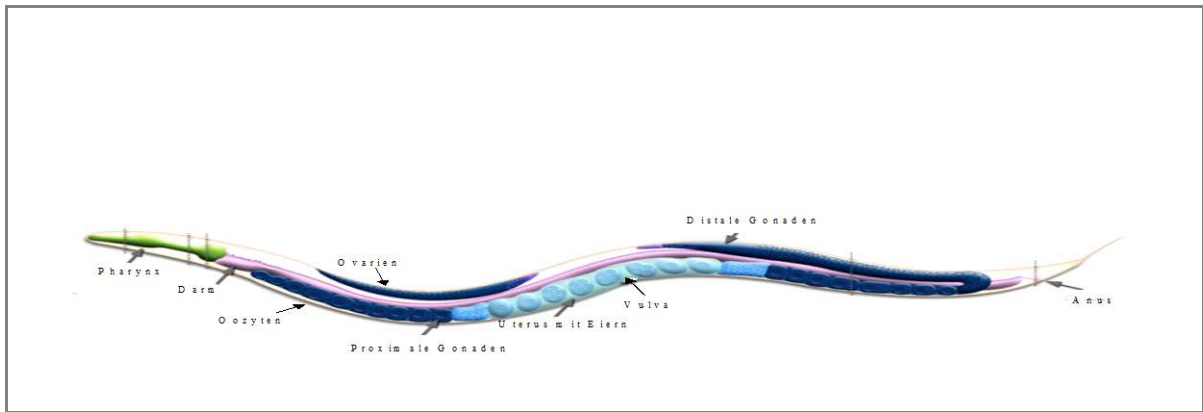


Abbildung 2 Schema eines adulten Hermaphroditen [6]

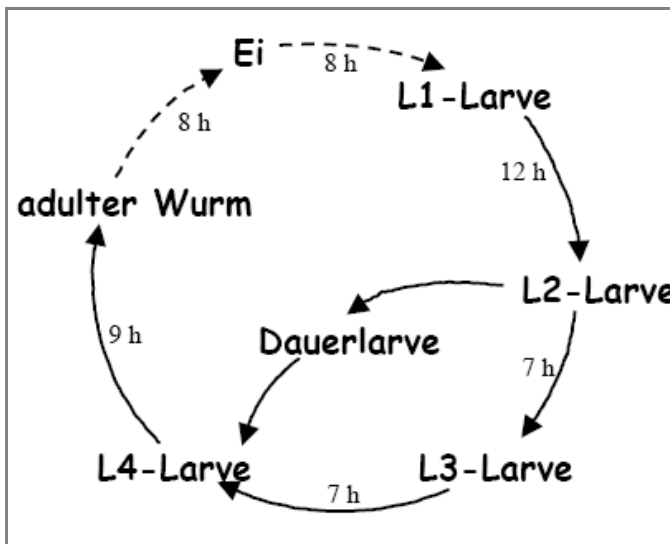


Abbildung 3 Der Lebenszyklus von *C. elegans*. Die Zeitangaben dokumentieren die Dauer der einzelnen Entwicklungsstadien unter Laborbedingungen und gelten für eine Umgebungstemperatur von 25 °C. Der gesamte Zyklus dauert unter diesen Bedingungen rund 3 Tage. Durchgezogene Pfeile markieren einen Häutungsschritt [7].

	<i>C. elegans</i>	<i>O. volvulus</i>
Phylum	Nematoda	Nematoda
Klasse	Secernentea V	Secernentea V
Ordnung	Rhabditida	Spirurida
Überfamilie	Rhabditoidea	Filarioida
Familie	Rhabditidae	Onchocerciadae

Abbildung 4 Systemische Einordnung der Nematoden *C. elegans* und *O. volvulus*

1.2 Posttranslationale Modifikation mit Phosphorylcholin (PC)

Posttranslationale Modifikationen sind auch für Nematoden essentiell, einerseits für den eigenen Stoffwechsel, andererseits um im Wirtsorganismus überleben zu können. So werden z.B. über Phosphorylierungen und Glykolysierungen wichtige Prozesse wie die Signaltransduktion, die Differenzierung, die Entwicklung und der Metabolismus reguliert [8]. Verantwortlich dafür sind Kinasen und Phosphatasen bzw. Glykosyltransferasen und Glykosidasen, welche dadurch zur Aktivierung bzw. Deaktivierung von Proteinen und zellulären Wegen beitragen [9].

Bei den Glykokonjugaten werden abhängig von der Bindung ans Peptidrückrat *N*- und *O*-Glykane voneinander unterschieden. Die Bindung der Glykane an die freie Aminogruppe von Asparagin wird als *N*-Glykosylierung, die Bindung an die freie Hydroxylgruppe von Serin oder Threonin als *O*-Glykosylierung bezeichnet [10]. Aus einer Beeinträchtigung dieser *N*- bzw. *O*-Glykosylierung können Störungen der Entwicklung und der Fertilität resultieren [11-16]. Bei *C. elegans* konnte sowohl eine stadienabhängige *N*-Glykansynthese als auch eine stadienabhängige PC-Substitution der *N*-Glykane aufgezeigt werden [17], (s. Abb. 5).

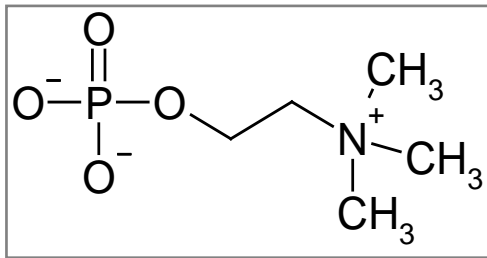


Abbildung 5 Struktur von PC

Innerhalb des Cholin-Metabolismus sind in *C. elegans* bislang 4 Stoffwechselwege nachgewiesen worden (s. Abb. 6):

Beim Kennedy-Weg wird der γ -Phosphatrest von ATP mithilfe der Cholin-Kinase auf Cholin übertragen, so dass PC entsteht. Die Cholin-Cytidylyltransferase setzt PC unter Abspaltung des Pyrophosphates von CTP zu CDP-Cholin um. Mithilfe der Cholin-Phospho-Transferase wird unter Beteiligung des 1,2-Diacylglycerins das Phosphatidylcholin (Ptd-C) gebildet [18]. Der Bremer-Greenberg-Weg gelangt über die schrittweise enzymatische Methylierung des Phosphatidylethanolamins (PE) mithilfe von S-Adenosylmethionin (SAM) über die Bildung des Phosphatidylmonomethylethanolamins (Ptd-MeE) und Phosphatidyl-dimethylethanolamins (Ptd-Me₂E) zum Ptd-C. Das Phosphatidylethanolamin kann über die Decarboxylierung des Phosphatidylserins (Ptd-S) gewonnen werden.

In neuen Studien konnte ein PE-Methyltransferase-Weg aufgezeigt werden, bei dem in *C. elegans* das PE mithilfe von zwei N-Methyltransferasen schrittweise zu PC methyliert wird. Die Phosphoethanolamin-N-Methyltransferase (PMT-1) überträgt die erste Methylgruppe des S-Adenosyl-Methionins auf PE und die PMT-2 katalysiert den Transfer der zwei weiteren Methylgruppen. Dieser Stoffwechselweg scheint neben seiner Funktion der PC-Synthese auch eine Rolle für das Wachstum und die Entwicklung der Nematoden zu spielen, was in RNAi-Experimenten mit *C. elegans* durch Hemmung der PMT-1 und PMT-2 ersichtlich wurde. Neue Studien gaben Hinweise auf einen Serin-Decarboxylierungs-Phosphoethanolamin-Methylierungsweg, bei dem durch die Decarboxylierung des Serins zunächst Ethanolamin und daraus durch die Phosphorylierung mithilfe von ATP PE entsteht, welches danach wie beim PE-Methyltransferase-Weg methyliert wird [19], (s. Abb. 6).

Trotz intensiver Forschung gelang es bis heute jedoch nicht, den Donor für das PC und die an der Synthese beteiligten Transferasen für die Modifikation von Proteinen und Glykosphingolipiden mit PC zu identifizieren.

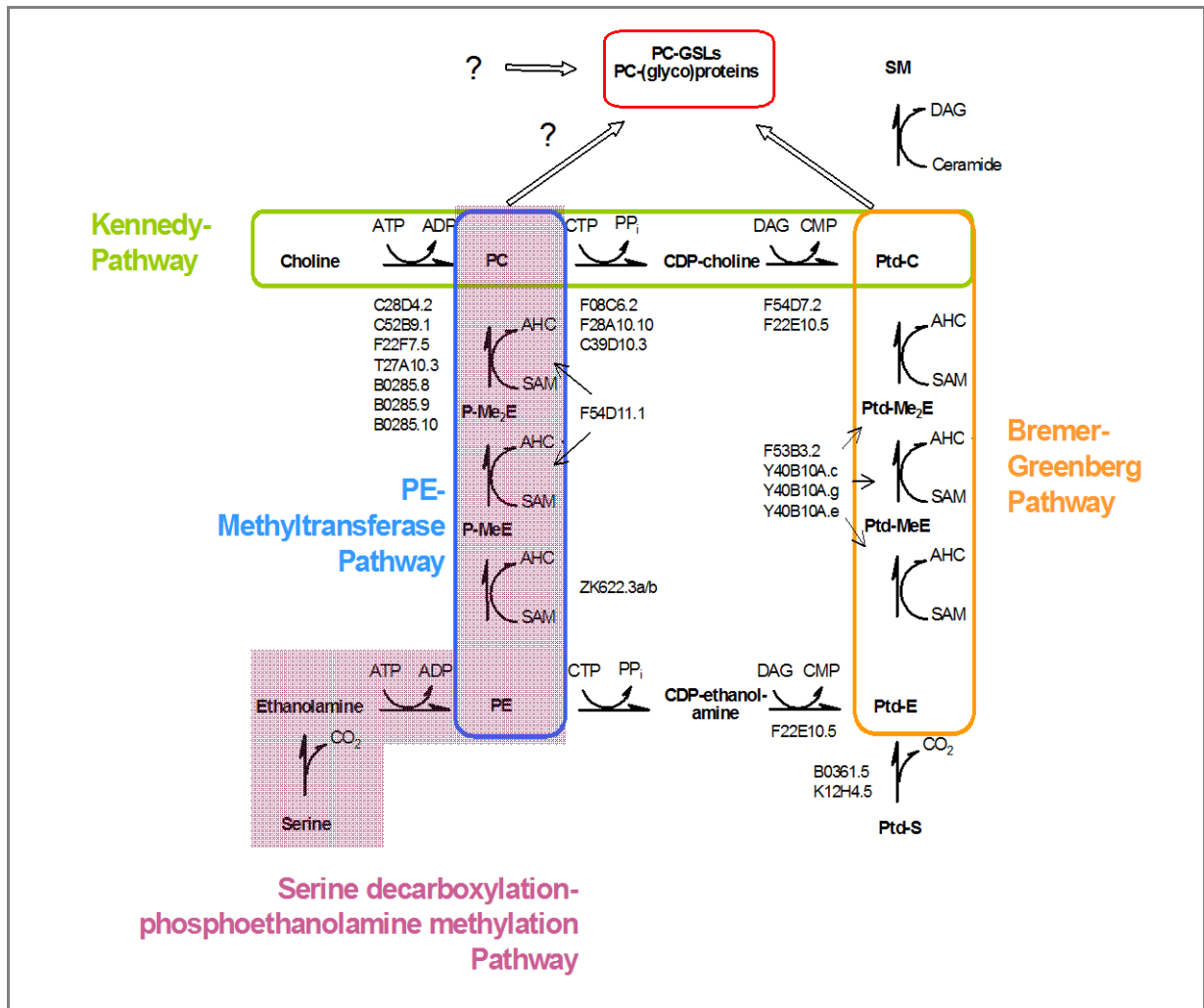


Abbildung 6 Biosynthetische Wege des Cholin-Metabolismus [20-21], PE-Phosphorylethanolamin, P-MeE-Phosphomonomethylethanolamin, P-Me₂E-Phosphodimethylethanolamin, Ptd-S- Phosphatidylserin, Ptd-MeE-Phosphatidylmonomethylethanolamin, Ptd-Me₂E-Phosphatidylmethylethanolamin, Ptd-C, Phosphatidyl-Cholin, PC-Phosphorylcholin, CDP-Choline- Cytidin-5'-diphosphat-Cholin

1.3 Parasitäre Nematoden

Über die Aufnahme von Eiern (Ascaris, Enterobius, Trichuris), durch aktives Eindringen von Larven (Necator, Ancylostoma, Strongyloides), durch die Aufnahme von im Wasser lebenden Flöhen (Dracunculus) oder auch durch Insekten (Filarien) kommt es zur Aufnahme der Erreger. Die Würmer können sich im Intestinaltrakt, in der Unterhaut, in den Augen, in der Pleurahöhle oder in Lymphgefäßen des Menschen ansiedeln.

Filariosen gehören zu den Krankheiten, die in Säugetieren durch parasitische Fadenwürmer ausgelöst werden. Über 150 Millionen Menschen sind fortlaufend mit diesen Erregern verschiedener Formen der Filariasis in über 80 Ländern infiziert, weitere Milliarden Menschen tragen ein Infektionsrisiko [1].

Zu den wichtigsten Beispielen der Filariose in heutiger Zeit zählen die in Afrika und Amerika weit verbreitete Flussblindheit, die sogenannte Onchozerkose, und die in den Tropen auftretende lymphatische Filariose.

Die Onchozerkose kommt vor allem in tropischen Gebieten Afrikas, Mittel- und Südamerikas vor. Die Sahelzone, Togo und Ghana sind Gebiete, in denen die Erreger weit verbreitet sind (s. Abb. 7). Die WHO zählt die Onchozerkose zu den sieben wichtigsten Tropenkrankheiten mit folgeschwersten Problemen der Weltgesundheit, da mittlerweile über 18 Millionen von insgesamt 37 Millionen infizierten Menschen [22-23], in Afrika und Zentralamerika betroffen sind. 350.000 Menschen sind bereits erblindet, 500.000 Menschen leiden unter erheblichen Sehstörungen, 6 Millionen unter Hauterkrankungen und für 120 Millionen Menschen besteht ein hohes Infektionsrisiko [24].



Abbildung 7 Geographische Verbreitung der Onchozerkose in Afrika, Kleinasien, Zentral- sowie nördliches Südamerika [25]

Die Erkrankung ist durch schwere Augenkomplikationen (s. Abb.8) charakterisiert, die im schlimmsten Fall zur Erblindung führen können. Die Onchozerkose ist auch eine systemische

Krankheit, die mit muskuloskeletalem Schmerz, vermindertem Body Mass Index und herabgesetzter Arbeitsproduktivität einhergeht. Dies könnte damit zusammenhängen, dass Mikrofilarien zahlreiche Gewebe und Organe infiltrieren und in Blut und Urin gefunden werden können [26].

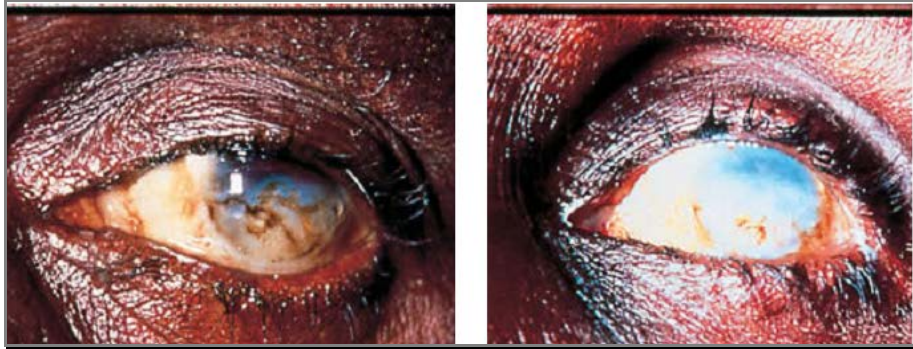


Abbildung 8 Sklerosierende Keratitis bei Onchozerkose, [27-28]

Die Onchozerkose ist eine sogenannte Mikrofilariose, welche hauptsächlich durch *O. volvulus* hervorgerufen und durch den Zwischenwirt, eine Kriebelmücke der Gattung *Simulium*, übertragen wird. Der Ausdruck Flussblindheit leitet sich von dem Vorkommen der Krankheit, meist in der Nähe von schnellfließenden Gewässern, ab. Grund dafür ist, dass die Larven der Kriebelmücken in solchen Gewässern aufwachsen, um sich im adulten Stadium von Menschen in der näheren Umgebung zu ernähren. Dabei dient vor allem der Mensch, seltener andere Primaten, als Reservoir. Die Mikrofilarien werden von den adulten weiblichen Würmern, den sogenannten Makrofilarien, nach der Geschlechtsreife innerhalb der bindegewebigen Knoten im Menschen geboren. Sie verlassen die Knoten, um sich innerhalb der Epidermis des Wirts fortzubewegen und gelangen dabei in alle dermalen Anteile und somit auch in die Augen. Einige dieser Mikrofilarien werden wiederum von der Kriebelmücke während einer Blutmahlzeit aufgesaugt und wandern im Überträger durch die Darmwand in die Thoraxmuskulatur ein, wo sie mehrere Reifungsstufen bis zur infektiösen Larve durchlaufen. Diese werden beim nächsten Stich wieder in den Menschen gebracht, wo sich aus den Larven innerhalb von 3 bis 12 Monaten die adulten Makrofilarien entwickeln, eine Größe von 70 cm erreichen und über 15 Jahre überleben können. Es werden grundsätzlich drei verschiedene Krankheitsbilder unterschieden: Der Knoten (Onchozerkom) mit Makrofilarien, Hauterscheinungen mit Juckreiz und im Endstadium Atrophie und der Augenbefall als schwerste Komplikation. Die Mikrofilarien sind

in der Lage, alle Schichten des Auges zu befallen. Der Larvenbefall in den vorderen Augenabschnitten führt zu Konjunktivitis, Keratitis, Iridozyklitis, Uveitis, sekundärem Glaukom und Katarakt (s. Abb.8). Toxisch allergische Prozesse in den hinteren Augenabschnitten führen zur Neuritis nervi optici, Retinitis und Optikusatrophie [29-31]. In Endemiegebieten lässt die Onchozerkose 3-7 % der Patienten erblinden und dominiert somit als Erblindungsursache. Die Bekämpfung der Onchozerkose begann 1974 in West Afrika mit dem von der Weltbank unterstützten **Onchocerciasis Control Programme (OCP)** in den sieben westafrikanischen Staaten Benin, Burkina Faso, Ghana, Elfenbeinküste, Mali, Niger und Togo. Im Jahre 1984 schlossen sich Guinea, Guinea-Bissau, Senegal und Sierra Leone dem Programm an. Heute gibt es im Kampf gegen die Onchozerkose das **African Programme of Onchocerciasis Control (APOC)** und das **Onchocerciasis Elimination Program of the Americas (OEPA)** und gegen die lymphatischen Filariosen das **Global Programme to Eliminate Lymphatic Filariasis (GPELF)**. Ein wichtiger Bestandteil dieser Programme besteht in der massenhaften Verteilung an Medikamenten (**Mass Drug Administration, MDA**). In Bezug auf die Onchozerkose konnte bereits in Kolumbien, Kenia und Teilen Ugandas die Prävalenz der Infizierten stark reduziert und in vielen lateinamerikanischen Ländern der Übertragungszyklus unterbrochen werden [32-35].

1.4 Medizinischer Status-Quo und Therapie der Onchozerkose

Die Therapie gegen die Onchozerkose besteht prinzipiell in zwei Möglichkeiten. Die erste Möglichkeit liegt in der Bekämpfung des Vektors, das heißt der Kriebelmücke. Diesen Weg hat die Weltgesundheitsorganisation mit einem Programm beschritten, bei dem in weiten Bereichen der Sahelzone per Helikopter Insektizide über die Flußläufe, die Brutplätze der Mücken, versprüht wurden. Dies ist sehr teuer, konnte aber aufgrund hoher Effizienz die Erkrankungsrate drastisch reduzieren, wenn auch nicht ausrotten. Die zweite Möglichkeit der Bekämpfung der Onchozerkose besteht im Einsatz einer Chemotherapie gegen die Würmer, mit dem Ziel, den Infektionszyklus zu unterbrechen. Bisher gibt es kein sicheres Medikament, das die Makrofilarien abtötet. Die heutige Chemotherapie der Onchozerkose zielt nur auf die Bekämpfung der Mikrofilarien. Für die individuelle Therapie und auch für die Massenbehandlung werden vor allem Medikamente gegen die Mikrofilarien wie Ivermectin

und Albendazol als Einzelpräparate oder häufiger in Kombination eingesetzt [22, 32, 36-37], um die Entstehung von Resistenzen zu verhindern [38-40]. Durch eine Kombinationstherapie von Ivermectin und Suramin, einem makrofilariziden Medikament, konnte eine Eindämmung der Transmission und eine Reduktion der Erblindungsfälle erreicht werden [41]. Das Ivermectin interagiert mit zahlreichen Ionenkanälen [42-48] der Parasiten und bewirkt zudem eine Paralyse der Muskulatur im Pharynx und der Körperwand der Nematoden [20, 49-50]. Da aber die Makrofilarien bis zu 15 Jahre im Körper überleben und zusammen täglich bis zu 50.000 neue Nachkommen produzieren, wird der Effekt der Chemotherapie innerhalb von Monaten nach Therapieende wieder aufgehoben. Zudem konnte die Entstehung von lebensgefährlichen neurologischen Reaktionen bei der Behandlung von Menschen beobachtet werden, die bereits an *Loa Loa* infiziert waren. Durch das massenhafte Absterben der Mikrofilarien wurden im Rahmen der Ivermectin-Therapie starke Nebenwirkungen beobachtet. Eine Behandlung von Kindern unter 5 Jahren und Schwangeren ist kontraindiziert. Eine Einzeltherapie mit Diethylcarbamazin wird derzeit umgangen, weil das Abtöten der okulären Mikrofilarien schwere Augenentzündungen induzierte [51]. Erschwert wird die Etablierung neuer Medikamente dadurch, dass in den betroffenen Ländern die finanziellen Mittel für die Forschung oder die Entwicklung von Medikamenten sehr knapp sind. Die WHO erklärt deshalb die Entwicklung von Medikamenten zur Filarienbekämpfung als höchstes Ziel [52-53]. Zu den neuesten Medikamenten gehört das Moxidectin, welches speziell gegen die Onchozerkose in den USA entwickelt wurde und bereits die Phase II der klinischen Studien abgeschlossen hat. Es scheint bezüglich seines mikrofilariziden Potentials ebenso effektiv zu sein wie das Ivermectin, eignet sich darüber hinaus zur Therapie mit Ivermectin-resistenten Larven und soll bis spätestens 2014 der Behandlung zur Verfügung stehen [21, 54].

Neue Studien des Hamburger Bernhard-Nocht-Institutes konnten zeigen, dass in den Würmern essentielle Endsymbionten leben, welche eine Art Koexistenz mit den Mikrofilarien führen. Durch langfristige Depletion inform chemotherapeutischer Intervention von *Wolbachia* wird die Reproduktion und das Überleben der Würmer beeinträchtigt. Tägliche Behandlung mit 100 mg Doxycyclin über einen Zeitraum von 6 Wochen (oder 200 mg tgl. über 4 Wochen) führte zu einer Unterbrechung der Embryogenese, die ≥ 18 Monate anhielt [52, 55]. Dies wiederum hatte ein geringeres

Wachstum und eine Sterilisierung der weiblichen Würmer zur Folge, wobei unerfreuliche Nebenwirkungen durch das Abtöten der Filarien ausblieben [56]. Dabei konnten aktuelle Studien zeigen, dass die Vernichtung der Wolbachia-Bakterien mit einer Reduktion des Vascular endothelial growth factor (VEGF) einherging, welches für die Lymphangiogenese notwendig war [51]. Ähnliche Beobachtungen konnten bei Nagetieren gemacht werden, die mit der Filarie *Litosomoides sigmodontis* infiziert waren. Nach der Behandlung mit Tetrazyklin gegen Endobakterien war die Entwicklung und die Fertilität des weiblichen Wurms beeinträchtigt [57-58]. Die verschiedenen Kontraindikationen gegen Antibiotika wie Doxycyclin, die lange Behandlungsdauer sowie die Gefahr, Resistenzen bei anderen Krankheitserregern herbeizuführen, erschweren es jedoch, diese Behandlung in Massenchemotherapieprogrammen anzuwenden. Hinzu kommt, dass es für schwangere oder stillende Frauen und Kinder unter 9 Jahren kontraindiziert ist. Neben dem Doxycyclin wird derzeit untersucht, wie hoch das antifilarizide Potential des Rifampicins ist [51]. Erforderlich für einen langfristigen Schutz gegen die Nematodenerkrankungen ist somit die Entwicklung makrofilarizider Medikamente, bzw. eines Vakzines, oder aber eine vollkommene Sterilisation der adulten Würmer, um der Neubildung von Mikrofilarien und somit auch der Entstehung der Onchozerkose effektiv zu begegnen.

1.5 Immunmodulation durch parasitäre Nematoden

Das Verständnis der langen Persistenz von Nematodeninfektionen und die Entwicklung neuer Medikamente mit antihelminthischem Potential setzt die Kenntnis über die immunmodulierenden Eigenschaften der Nematoden voraus. Die Identifizierung von biochemischen Zielstrukturen ist die Bedingung für die Entwicklung effektiver und spezifischer Medikamente.

Um sich gegen das Immunsystem des Wirtes durchzusetzen, haben die Nematoden im Laufe der Evolution diverse Abwehrstrategien entwickelt:

Durch Veränderungen der Morphologie wie z.B. der Cuticula, die sich im Laufe der Individualentwicklung an die äußeren Bedingungen anpassen kann oder der Aufnahme von Wirtsantigenen schützen sich die Nematoden vor dem Wirt (**molekulares Mimikrie**).

Eine eher aktive Strategie ist die Verwendung parasitenspezifischer Antigene wie z.B. der PC-Modifikation von Proteinen und Glykosphingolipiden zur Immunmodulation des

Abwehrsystems des Wirtes. Über die **Struktur der PC-Epitope** in Nematoden ist bereits Einiges bekannt, so wurde z.B. in *Acanthocheilonema viteae* ES-62, ein Glykoprotein von mit einem Molekulargewicht von 62 kDa, gefunden. Hier wurde eine Bindung des PC-Epitopes über eine *N*-Glykanverbindung nachgewiesen. Massenspektrometrische Analysen konnten zeigen, dass die PC-substituierten *N*-Glykane von ES-62 aus Trismannosylkernstrukturen bestehen, welche teilweise fucolysiert vorliegen. Dabei erfolgte die Bindung des PCs über terminale *N*-Acetylglucosaminreste [59].

Die Strukturen der *N*-Glykane von *O. volvulus* und *O. gibsoni* weisen Gemeinsamkeiten auf zu denen von *A. viteae* (s. Abb. 9). Während bei *A. viteae* und *O. gibsoni* allerdings Kernfucolysierungen nachweisbar waren, lagen die *N*-Glykane von *O. volvulus* hauptsächlich unfucolysiert vor [60] (s. Abb. 9).

In *B. malayi* konnte durch Western-Blott-Analysen mit monoklonalen Antikörpern gegen das PC die Modifikation von Glykoproteinen mit PC aufgezeigt werden. Zudem wurde gezeigt, dass die PC-Substitution innerhalb der sekretorisch-exkretorischen Produkte von *B. malayi* stärker in der *N*-Acetylglucosaminyltransferase als im ES-62-Homolog dieses Parasiten aufzufinden war.

PC-substituierte Proteine finden sich auch bei freilebenden Nematoden. Bei *C. elegans* konnte zuerst die Aspartylprotease 6, ASP-6, als PC-substituiertes Protein identifiziert werden. Dabei erfolgt die Bindung der PC-Reste vermutlich entweder über eine *O*-Glykanbindung oder eine direkte Verknüpfung mit der Aminosäure [61].

Die meisten der PC-modifizierten Proteine von *C. elegans* wurden im Eistadium und im adulten Stadium nachgewiesen. Es wurde gezeigt, dass die meisten PC-modifizierten Proteine im Eistadium eine Aufgabe im Proteinstoffwechsel einnehmen, während im adulten Stadium der größte Anteil am Energie- und Redoxstoffwechsel beteiligt zu sein scheint.

Die identifizierten PC-modifizierten Proteine waren vorwiegend im Cytosol und in den Mitochondrien lokalisiert [62-63].

Die PC-Epitope von ASP-6 in *C. elegans* werden im Laufe der Entwicklung verstärkt exprimiert und erreichen somit im adulten Stadium die höchste Expression [61]

Bei *O. gibsoni* wurden zudem PC-Epitope auf *O*-Glykanen aufgezeigt [64].

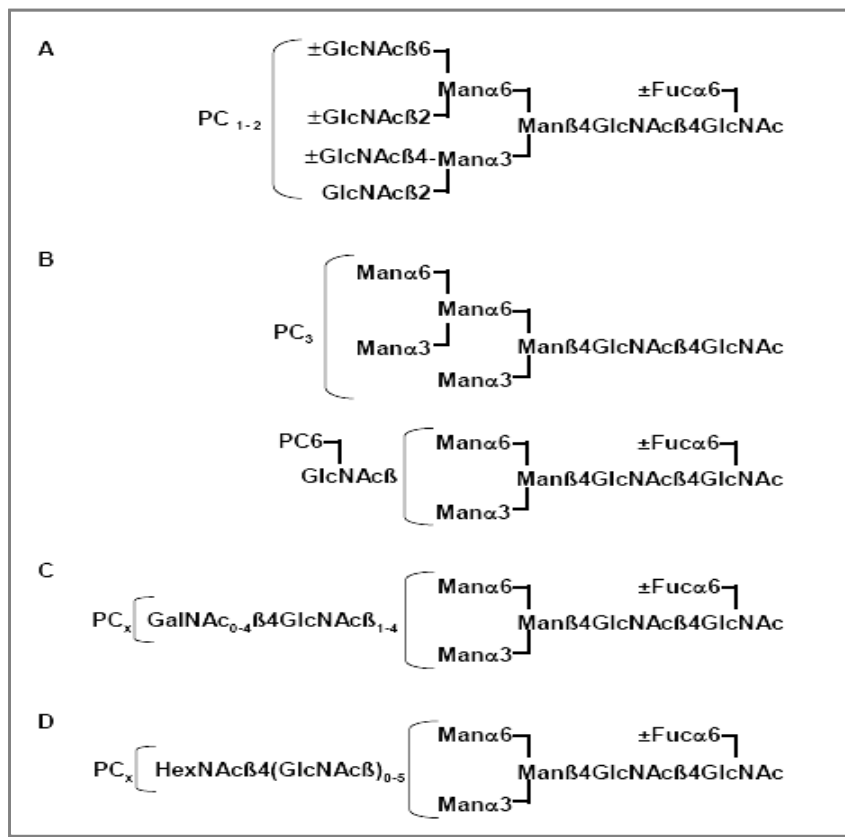


Abbildung 9 Publierte PC-substituierte N-Glykan-Strukturen von *A. viteae* (A), *C. elegans* (B), *T. spiralis* (C), *O. volvulus* und *O. gibsoni* (D).

PC-konjugierte Glykosphingolipide konnten bereits bei zahlreichen parasitären und freilebenden Nematoden nachgewiesen werden [65-68]. Die PC-substituierten Glykosphingolipide können als phylogenetischer Marker für Nematoden angesehen werden. Untersuchungen an *A. suum* zeigten neutrale, saure und zwitterionische Glykolipide auf. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die neutralen und zwitterionischen Glykolipide die Kernstruktur GlcNAc(β 1-3)Man(β 1-4)Glc-Ceramid aufweisen [69]. Während die sauren Glykolipide Phosphoinositol- und Sulfathaltige Glykosphingolipide umfassen, tragen zwitterionische einen PC- und teilweise zusätzlich Phosphorylethanolaminrest [68, 70]. Dabei erfolgt die Bindung des PCs an das C6 des N-Acetylglucosamins (GlcNAc). Phosphorylethanolamin dagegen ist an das C6 der Man gebunden [68, 71]. Es konnten bei *C. elegans* und einer Reihe von parasitären Nematoden wie z.B. *O. volvulus* analoge Glykosphingolipidstrukturen gefunden werden [72], (s. Abb. 10).

	<i>C. elegans</i>	<i>A. suum</i>	<i>O. volvulus</i>
PC-6_1 GlcNAc β 3Man β 4Glc β -Cer		+	+
PC-6_1 GalNAc β 4GlcNAc β 3Man β 4Glc β -Cer	+	+	+
PC-6_1 Gal α 3GalNAc β 4GlcNAc β 3Man β 4Glc β -Cer	+	+	+
PC-6_1 Gal β 3Gal α 3GalNAc β 4GlcNAc β 3Man β 4Glc β -Cer	+	+	
PC-6_1 Gal α 3GalNAc β 4GlcNAc β 3Man β 4Glc β -Cer		+	

Abbildung 10 Vorkommen PC-haltiger Glykosphingolipide der Arthroserie [60].

Die **Biosynthese** der PC-Modifikation in Nematoden wurde anhand von ES-62 in *A. viteae* näher untersucht [73]. In verschiedenen Studien mit unterschiedlichen Inhibitoren konnte gezeigt werden, dass die Bindung des PC-Restes an das Protein als posttranslationaler Prozess im Lumen des Golgi-Apparats stattfindet. Wurden die adulten Würmer mit Tunicamycin, einem Inhibitor der *N*-Glykosylierung der Proteine und des Transports der aktivierten Zucker versetzt, oder aber mit 1-Deodymannojirimycin, einem Inhibitor des Glykanisierungsprozesses im cis- Golgi-Netzwerk, so konnte kein PC-haltiges ES-62 nachgewiesen werden [74-78].

Ähnliche Ergebnisse wurden in den exkretorisch-sekretorischen Produkten von *B. pahangi* gefunden [79]. Es wurde daher für ES-62 in *A. viteae* zunächst vermutet, dass entweder Ptd-C oder aber CDP-Ethanolamin als Donoren der PC-Synthese dienen könnten [18, 76]. Durch Inhibierung mittels Hemicholinium-3 wurde gezeigt, dass die Cholin kinase als erstes Enzym des Kennedy-Weges für den Einbau des PCs in das ES-62 notwendig ist [80]. Im Gegensatz dazu hatte die Inhibierung der PC-Cytidyltransferase (CTP) durch Hexadecyl-PC scheinbar keinen Effekt auf den Transfer von PC in ES-62.

Ptd-C konnte als direkter Donor der PC-Epitope ausgeschlossen werden, da eine radioaktive Markierung im Ptd-C ca. 20h vor der Markierung im ES-62 nachweisbar war und diese Verzögerung einen direkten Übertragungsweg unwahrscheinlich macht.

Sphingomyelin (SM) wurde als Donor des PC-Epitopes ebenfalls ausgeschlossen, da eine radioaktive Markierung von SM erst wesentlich später als im ES-62 nachweisbar war. Dieses Ergebnis wird dadurch untermauert, dass die Sphingomyelin-Synthese vorwiegend im Trans-

Golgi-Netzwerk lokalisiert ist, während die PC-Modifikation von ES-62 im medialen Golgi-Netzwerk lokalisiert ist [1]. *In-vitro* Experimente an *C. elegans* konnten zeigen, dass Ptd-C als Donor der PC-Reste geeignet ist [81].

Die **biologische Funktion der PC-Epitope** an Glykoproteinen und Glykosphingolipiden der Nematoden ist vielseitig:

So kommt es durch die Anwesenheit des PCs zur Immunmodulation, wodurch eine Unterdrückung der zellulären Immunantwort im Wirtsorganismus bewirkt wird. Dies führt zur erhöhten Persistenz, zur Verbesserung der Entwicklung und Fertilität des Erregers.

Der erste Nachweis dieser immunmodulierenden Wirkung der PC-Antigene gelang an *Trichinella spiralis* in infizierten Mäusen und es folgten Nachweise in *Brugia*, wo das PC bei der Unterdrückung der T-Zellantwort beteiligt zu sein scheint [82-83]. Die Proliferation von B- und T-Lymphozyten wird durch die Aktivierung zellulärer Phosphatasen gezielt herunterreguliert [1, 60, 84-85]. PC-modifizierte Antigene der Filariose-Erreger unterstützen den TH2-Phänotypen der Immunantwort durch Unterdrückung einer IL-12-Freisetzung durch Makrophagen. Außerdem stimulieren sie die IL-10 Produktion der B-Zellen, welche wiederum die TH1-Zellentwicklung hemmt [86].

Aktuelle Studien konnten zeigen, dass das ES-62 von *A. viteae* eine antiinflammatorische Wirkung bei der Kollagen-induzierten Arthritis und bei der rheumatoiden Arthritis ausübt. Dabei konnte gezeigt werden, dass für dieses Potential die PC-Epitope von ES-62 verantwortlich sind [87]. Es gibt Hinweise darauf, dass eine Infektion mit Helminthen (z.B. *Schistosoma mansoni*, *Trichinella spiralis*) bestimmte Autoimmunerkrankungen wie Diabetes, Asthma, allergische Enzephalomyelitis und rheumatoide Arthritis verhindern bzw. verzögern kann [88].

Zudem finden Interaktionen zwischen dem ES-62 und spezifischen Zellen des Immunsystems wie B-Lymphozyten, dendritischen Zellen, Makrophagen und Mastzellen statt, wobei darüber hinaus eine Abhängigkeit vom TLR-4 und diversen Molekülen des Signaltransduktionsweges angenommen wird [89].

1.6 Ziel der Arbeit

Nematodenerkrankungen stellen für die medizinische Forschung eine große Herausforderung dar. Durch die derzeitigen Kontrollprogramme wie APOC, OEPA und GPELF konnten im Rahmen des MDA bereits viele Erfolge erzielt werden. Es gelang bis heute jedoch nicht, die Infektionskette der Nematoden durch die derzeitige medikamentöse Therapie zu unterbrechen. Bis heute wurde nicht im Detail geklärt, wie die Nematoden sich dem Abwehrsystem des Wirtes so widersetzen, dass sie über viele Jahre hinweg in diesem überleben können.

Die Modifikation einer Vielzahl von Proteinen mit PC sowohl in parasitären als auch in freilebenden Nematoden deutet auf wichtige biologische Funktionen in diesen Organismen hin. Diese biologischen Funktionen setzen PC- bindende Proteine in diesen Organismen voraus.

Daher hat sich die Arbeit zur Aufgabe gemacht, eine Methode zur Isolation PC-bindender Proteine von *C. elegans* zu etablieren und zu optimieren. Diese Methode sollte im zweiten Teile der Arbeit Grundlage für die massenspektrometrische Identifikation dieser PC-bindenden Proteine von *C. elegans* sein.

Die Identifikation PC-bindender Proteine soll zu einem besseren Verständnis der biologischen Funktion der PC-Modifikation beitragen.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Geräte und Chemikalien

Universal 32R-Zentrifuge, Hettich, Tuttlingen

Zentrifuge 5415 D, Eppendorf, Hamburg

Ultraschallhomogenisator CL 60161B, Branson, Danbury, Connecticut, USA

Digitale Waage BP 6, Sartorius, Göttingen

Speed Vac RC 10.22. Jouan, RC.10.22, Thermo, Fernwald

Ultraschallbad Elmasonic S40, Elma, Singen

Gefriertrockner Alpha 1-4, Christ, Osterode am Harz

Spektrophotometer DU 640, Beckmann, Krefeld

Rehydratisierung Reswelling Tray und Multiphor II, GE Healthcare, Freiburg

Elektrophoresis Stromversorgung EPS 3501 XL, GE Healthcare, Freiburg

ExQuest Spot-Cutter, BioRad, München

Digester Hamilton Microlab, Star LET, Hamilton Robotics, München

Bruker Ultraflex I TOF/TOF MALDI, Bruker Daltonik, Bremen

Soweit nicht anders vermerkt, wurden die verwendeten Chemikalien in p.a.-Qualität bezogen (Merck, Darmstadt; Roth, Karlsruhe; Fluka, Neu Ulm; Serva, Heidelberg; Sigma, Taufkirchen). Wasser wurde mit dem *Milli-Q Ultra-pure water system* (Millipore, Eschborn) entsalzt und gereinigt.

2.2 Kultivierung von *C. elegans*

2.2.1 Kultivierung auf Agarplatten

Zur Kultivierung von *C. elegans* wurde eine Agarlösung mit folgenden Bestandteilen angesetzt:

5 g Caseinhydrolysat (Pepton 140, Merck)

5 g Hefeextrakt (Life Technology, Eggenstein)

3 g NaCl

20 g Agar, high gel-strength (Serva)

Diese Lösung wurde mit Wasser auf 1L aufgefüllt und danach 20 min bei 120 °C autoklaviert.

Nun erfolgte die Zugabe folgender steriler Lösungen:

1,0 ml Cholesterinlösung (5,0 g Cholesterin/ 1L Ethanol)

0,5 ml CaCl₂-Lösung (110, 8 g CaCl₂/ 1L H₂O)

1,0 ml MgSO₄-Lösung (246,5 g MgSO₄/ 1L H₂O)

25 ml Kaliumphosphat-Lösung (108,3 g KH₂PO₄ und 36 g K₂HPO₄/ 1L H₂O)

2,0 ml Thiabendazol (10 mg/ ml Thiabendazol in Dimethylsulfoxid)

2,0 ml 0,1% Methylenblau in H₂O

Die genannten Bestandteile wurden nach guter Durchmischung jeweils in einer 0,5 cm dicken Schicht in eine Petrischale mit 145 mm Durchmesser gegossen und über Nacht bei Raumtemperatur stehen gelassen.

2.2.2 Kultivierung mit hühnereihaltigem Nährboden

Für das Hühnereimedium auf der Agarplatte wurde ein Ei mit 50 ml kochendem Wasser versetzt und ausreichend geschüttelt. Die Flüssigkeit wurde abdekantiert und das Ei anschließend homogenisiert. Je 5 ml dieses Homogenates wurden auf eine Agarplatte gegeben. Anschließend wurden mit einer Pipette 500 µl-*C. elegans*-Suspension (~2000 Würmer) auf die Agarplatte gebracht und die Würmer bei 18 °C etwa 4 Wochen kultiviert.

2.3 Aufreinigung von *C. elegans*

Die Würmer wurden von den Agarplatten mit 15 ml M 9-Puffer abgespült und die Flüssigkeit anschließend in ein 50 ml-Zentrifugenröhrchen überführt.

Zusammensetzung des M9-Puffers:

250 ml Phosphatpuffer (60 g KH₂PO₄, 120 g Na₂HPO₄), pH=6

25 g NaCl
5 ml 1 mol/ L MgSO₄
auf 5 L mit H₂O auffüllen

Die *C. elegans*-Puffermischung wurde zur Sedimentation der Würmer für etwa 15 min auf Eis gestellt und der Überstand abdekantiert. Zur Entfernung der unerwünschten Kontaminationen wie Zelltrümmern, Bakterienresten und Häutungsaggregaten wurde eine Dichtezentrifugation durchgeführt [90], um die Nematoden zu reinigen. Hierbei wurde der Überstand entfernt und die verbleibende Flüssigkeit mit M 9-Puffer auf 15 ml aufgefüllt. Zur weiteren Reinigung wurden die Würmer mit 10 ml 30 % Saccharoselösung unterschichtet und anschließend bei 1500 g für 7 min zentrifugiert. Die *C. elegans* in der Saccharoseschicht wurden in ein neues Zentrifugenröhrchen (V=50 ml) überführt und anschließend dreimal mit M9-Puffer gewaschen. Die gewaschenen Würmer wurden zunächst im Gefrierschrank bei – 20 °C für 1 Tag gelagert. Anschließend erfolgte eine Gefriertrocknung, nach der die Probe für weitere Versuche zur Verfügung stand.

2.4 Proteinextraktion

Es wurden 50 mg des lyophilisierten *C. elegans* –Rohmaterials (s. 2.3) in 1500 µl Lysispuffer (a, b, c) aufgenommen:

a) Tris-Lysispuffer: in 10 ml H₂O 24,4 mg Tris; 5,8 g NaCl, 10 µl Protease-Inhibitor (Sigma)

b) Lysispuffer ohne CHAPS: in 10 ml H₂O 3,6 g Harnstoff, 1,5 g Thioharnstoff, 24,2 mg Tris, 10 µl Protease-Inhibitor (Sigma)

c) Lysispuffer mit CHAPS: in 10 ml H₂O 3,6 g Harnstoff, 1,5 g Thioharnstoff, 24,2 mg Trishydroxymethylaminoethan, 400 mg CHAPS, 10 µl Protease-Inhibitor (Sigma)

Die Wurmlösungen wurde jeweils für 1 min gevortext, 2x 5 min ins Ultraschallbad gestellt (< 30 °C) und bei Bedarf zusätzlich 3x 20 s mit dem Ultraschallstab behandelt. Eventuell noch

vorhandene Zelltrümmer wurden durch eine letzte Zentrifugation bei 20.000 xg für 30 min bei 10 °C beseitigt und der gewünschte Überstand wurde schließlich in Eppis (V=2ml) überführt. Die Eppis wurden nach der Proteinbestimmung (s. 2.5) eingefroren und lyophilisiert. Im Folgenden wurden die Proteine direkt für die Gelelektrophorese gefällt (s. 2.7) oder erst für die Herstellung des Eluatmaterials in der Affinitätschromatographie weiterverarbeitet (s. 2.6).

2.5 Proteinbestimmung

Mithilfe des 2-D Quant Kits (GE Healthcare) wurde an dem im Lysispuffer gelösten Material (s. 2.4) die Proteinbestimmung durchgeführt. Durch frühere Studien konnte bereits gezeigt werden, dass der Lysispuffer die Proteinbestimmung im 2D-Quant Kit nicht beeinträchtigt. Es wurde zunächst das *Working Color reagent* durch die Mischung von 100 Teilen des *Color reagent A* mit 1 Teil des *Color reagent B* hergestellt. Es wurde die Eichreihe mithilfe des 2 mg/ ml *BSA Standard Solution* nach folgendem Schema hergestellt:

Volumen von 2 mg/ml	0 µl	5 µl	10 µl	15 µl	20 µl	25 µl
<i>BSA Standard-Lösung</i>						
Proteinmenge	0 µg	10 µg	20 µg	30 µg	40 µg	50 µg

Von der zu bestimmenden Probe wurde ebenfalls 2x 15 µl in je ein Eppi gegeben und im Folgenden genauso behandelt wie die Eichreihe:

Es wurden in jedes Eppi 500 µl *Precipitant* gegeben, ausreichend gevortext und anschließend bei Raumtemperatur für 2-3 min inkubiert. Im nächsten Schritt wurden 500 µl

Co-Precipitant in jedes Eppi gegeben und ebenfalls ausgiebig gevortext. Die Eppis wurden bei min 10000xg für 5 min zentrifugiert, so dass das Protein sedimentierte. Die Flüssigkeit über dem Pellet wurde nach der Zentrifugation vorsichtig abdekantiert. Es wurden 100 µl *Copper-Solution* und 400 µl destilliertes Wasser in jedes Eppi gegeben und gevortext, um das Protein wieder in Lösung zu bringen.

Im nächsten Schritt erfolgte die schnelle Zugabe von 1 ml *Working-color reagent* und eine kurze Durchmischung jedes Eppis. Danach erfolgte eine Inkubation bei Raumtemperatur für

15-20 min. Im Folgenden konnte die Absorbance jeder Probe und des Standards bei 480 nm mit Wasser als Referenz im Spektrophotometer (Beckmann DU 640) abgelesen werden.

Es wurde mithilfe der gemessenen Werte eine Standardkurve erstellt, aus der die Proteinkonzentration der Probe abzulesen war. Nach der Proteinbestimmung wurden die Proben erneut lyophilisiert und anschließend im Gefrierschrank bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ aufbewahrt.

2.6 Affinitätschromatographie

2.6.1 Vorbereitung

Ausgangsprodukt für die Affinitätschromatographie war das im Lysispuffer gelöste, ungefällte Rohmaterial (s. 2.5).

Pufferherstellung für die Affinitätschromatographie:

Puffer A: 10 mM Tris, pH=7,5, 150mM NaCl, 1mM CaCl_2

Puffer B: 10 mM Tris, pH=7,5, 1mM CaCl_2

Elutionspuffer: 10 mM Tris, pH=7,5, 1mM PC, 1mM EDTA

Regenerationspuffer: 3 M NaCl

Jeder Puffer wurde nach der Herstellung gut geschüttelt und auf Eis gesetzt.

Vorbereitung der Affi-Beads mit Puffer A:

Je 2 ml Beads (immobilisiertes *p*-Aminophenyl-PC Gel, Pierce, Rockford) wurden gleichmäßig auf 3 Eppis verteilt, mit 200 μl Puffer A überschichtet und für 15 min inkubiert. Der Überstand wurde abgenommen. Nach erneuter Zugabe von 3000 μl Puffer A wurde die Waschung der Beads wiederholt.

Schließlich wurden die Beads mit neuen 1000 μl Puffer A überschichtet und für 1h im Kühlschrank bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert. Danach wurde der Puffer A abdekantiert.

2.6.2 Durchführung

1.Schritt: 1500 μl *C. elegans*-Proteinextrakt wurden mit 2400 μl Säulenmaterial und 10 ml Puffer A gemischt und bei Raumtemperatur 4 h auf dem Taumler inkubiert.

Nach abgelaufener Inkubationszeit wurde das Gemisch für 1 min bei 4 °C und 2500xg zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt und als Durchlauf gesammelt.

2. Schritt: Es erfolgte ein 4-maliger Waschvorgang in 10 ml Puffer B, wobei zwischendurch jeweils für 30 min inkubiert, danach für 1 min zentrifugiert und der Puffer-Überstand entfernt wurde.

3.Schritt: Nach Zugabe von 5 ml Elutionspuffer und einer Inkubationszeit von 45 min erfolgte eine 1 min- Zentrifugation. Der Überstand wurde in Eppis überführt und die Proteinmenge erneut bestimmt. Die Eluate wurden eingefroren und lyophilisiert.

4.Schritt: Zur Regeneration wurden die Beads mit 5 ml Regenerationspuffer 2 x 1 h inkubiert und 1 min zentrifugiert. Die regenerierten Beads wurden in 1 ml Puffer A aufgenommen und kühl gelagert.

Im Folgenden wurde das lyophilisierte Eluat entweder Aceton- oder Methanol-Chloroform gefällt (s. 2.7).

2.7 Fällungen

2.7.1 Vorbereitung

Zur Entfernung störender Ionen und Aufkonzentrierung der *C. elegans*-Proteine wurde entweder die Aceton- oder die Methanol-Chloroform-Fällung durchgeführt.

15mg des lyophilisierten *C. elegans*- Extraktmaterials wurden in 500 µl Lysispuffer A (s. 2.7.1) gelöst und 1 h bei 20.000 xg zentrifugiert.

Lysispuffer A:

360 mg Harnstoff

152 mg Thioharnstoff

40 mg CHAPS

10 mg DTT

10 µl Protease Inhibitor-Cocktail

30 µl Servalyte (Isodalt) 3-10

auf 1 ml mit H₂O auffüllen

2.7.2 Aceton-Fällung

Bei der Aceton-Fällung wurde der *C. elegans*- Proteinextrakt (s. 2.5) und das Aceton (-20 °C) im Verhältnis 1:7 für 5 min gevortext und über Nacht bei -20 °C gelagert.

Anschließend wurde das Eppi 10 Minuten bei -4 °C und 8510xg zentrifugiert, so dass sich ein Pellett am Boden abgesetzt hat. Der Acetonüberstand wurde abdekantiert und das Pellett 2x mit 300 µl Aceton (-20 °C) gewaschen. Bei der Waschung wurde das Eppi nach jeder Acetongabe geschüttelt, 5-10 min bei -20 °C gelagert und danach zentrifugiert.

Anschließend wurde der Acetonüberstand mit der Pipette vorsichtig abgesaugt, das Pellet 15 min im Abzug getrocknet oder mit N₂ trockengeblasen.

2.7.3 Methanol-Chloroform-Fällung

Die *C. elegans*-Proteinextrakt (s. 2.5) wurde zunächst für 1 h bei 20.000 g zentrifugiert und der Überstand zu jeweils 90 µl in kleine Eppis (V=2ml)überführt.

90 µl Aliquot, 400 µl Methanol und 100 µl Chloroform wurden für 5 min bei Raumtemperatur gevortext. Danach wurde jeweils 300 µl H₂O hinzugegeben, 5 min bei Raumtemperatur gevortext und 5 min bei 20000 xg zentrifugiert.

Es waren danach 3 Phasen erkennbar: Methanol/Wasser bildete die obere Phase, das Protein bildete die weiße Interphase und Chloroform setzte sich unten ab.

Die oberste Schicht wurde vorsichtig abgenommen, das Chloroform-Proteingemisch im Eppi mit 300 µl Methanol überschichtet und im Ultraschallbad gelöst. Nach einer Zentrifugationszeit von 5 min bei 20000xg wurde der Überstand verworfen und das Pellet im offenen Eppi für 5 min bei 40 °C aufgewahrt. Das Pellet wurde mit 50 µl Lysispuffer B (s. 2.6.3) im Ultraschallbad gelöst. Die entstandene Probe konnte im Folgenden für die isoelektrische Fokussierung weiterverwendet (s. 2.9.1) oder bei -20 °C eingelagert werden.

Lysispuffer B:

360 mg Harnstoff

152 mg Thioharnstoff

40 mg CHAPS

10 mg DTT

30 µl Servalyte 3-10

auf 1 ml mit H₂O auffüllen

2.8 Eindimensionale Gelelektrophorese

2.8.1 Entsalzung durch Gelfiltration

Es wurden 100 µl der jeweiligen Probe in 500 µl H₂O aufgenommen und für 5 min gevortext. Anschließend wurde die Probe auf die Nap-5-Säule aufgetragen. Nach dem Durchlauf der Probe wurde zur Elution 1 ml H₂O hinzugegeben. Das Eluat wurde über Nacht bei -20 °C eingefroren und anschließend lyophilisiert. Daraufhin konnte die entsalzte Probe weiterverarbeitet werden (s. 2.8.2).

2.8.2 1D-SDS-Gelelektrophorese

Acrylamidstammlösung:	100 ml Acrylamidstammlösung (Roth)
Trenngelpuffer:	36,3 g Tris/ HCl (Merck), pH=8,8 100 ml H ₂ O hinzugeben
Sammelgelpuffer:	6,0 g Tris/ HCl, pH=6,8 in H ₂ O 100 ml H ₂ O hinzugeben
SDS-Lösung:	10 g SDS 100 ml H ₂ O hinzugeben
Ammoniumperoxiddisulfat-Lösung:	0,1 g Ammoniumperoxidsulfat (AMPS)/ ml H ₂ O
Elektrodenstammpuffer, zehnfach:	15 g Tris, 72 g Glycin 500 ml H ₂ O hinzugeben
Elektrodenlaufpuffer:	100 ml Elektrodenstammpuffer, zehnfach 10 ml SDS-Lösung auf 1 Liter mit H ₂ O auffüllen

Die Acrylamidkonzentrationen betrugen 12 % im Trenngel und 4 % im Sammelgel.

Für zwei Gele mit 0,75 mm Dicke wurden 3,35 ml H₂O, 4,0 ml Acrylamidstammlösung und 2,5 ml Trenngelpuffer gemischt, 5 min im Ultraschallbad entgast und 5 min auf 50 °C erhitzt. Unter gründlichem Mischen wurden 100 µl SDS-Lösung, 50 µl AMPS (Serva) und 5 µl TEMED (Merck) hinzugefügt. 3,4 ml der Lösung wurde zwischen zwei auf Gelplatte-N-Halter eingespannte Glasplatten gegeben. Um eine gleichmäßige Oberfläche zu erreichen, wurde das Trenngelgemisch mit Amylalkohol überschichtet und 1 h ruhen gelassen. Nach der Polymerisation wurde das *N*-Butanol abgegossen und die Trenngeloberfläche gründlich mit H₂O gespült.

Für das Sammelgel wurden 6,1 ml H₂O, 1,3 ml Acrylamidstammlösung und 2,5 ml Sammelgelpuffer gemischt und 5 min im Ultraschallbad entgast. Anschließend wurden 100 µl SDS-Lösung, 5 µl AMPS und 10 µl TEMED hinzugegeben. Die Sammelgelmischung wurde auf das Trenngel pipettiert und der Kamm für die Probentasche aufgesetzt. Der verwendete Kamm formte 10 Auftragsaschen für ein Probenvolumen von je maximal 40 µl. Nach einer Polymerisationszeit von 45 min wurden die Kämmen entfernt, die Taschen mit H₂O gespült und die Elektrophoresekammer zusammengesetzt. In die innere Kammer wurden 125 ml und in die äußere Kammer 200 ml Elektrodenlaufpuffer eingefüllt.

Vor dem Auftrag auf das Sammelgel wurden die Proteinproben 10 Minuten bei 100 °C in 20 µl Probenpuffer gekocht.

SDS-Probenpuffer:

62,5 µl 1 M Tris / HCl, pH=6,8
10 µl 100 mM Na₂EDTA (Roth)
100 µl Glycerin (87 %)
200 µl SDS (10 %)
25 µl Bromphenolblau (0,25 %)
552,5 µl H₂O
50 µl 2-Mercaptoethanol (Merck)

Mit einer Hamilton-Spritze wurden Aliquots der Proben (20 µl) und des Standards (5 µl) auf das Gel aufgetragen. Als Standard für das SDS-Gel wurde BenchMarkTM Protein Ladder (Invitrogen, Karlsruhe) genommen.

Die Elektrophorese erfolgte zunächst für 15 min bei 100 V und dann für 65 min bei 150 V. Danach wurden die Gele entnommen, mit Commassie oder Silber gefärbt (s. 2.10).

2.8.3 Native Gelelektrophorese

Die native Tris-Glycin-Page basierte auf dem System der SDS-PAGE von Laemmli [91]. In Gel, Probenlaufpuffer und Laufpuffer war jedoch kein SDS enthalten. Die Zusammensetzung eines nativen 5-15 % Tris- Glycin-Gradientengels ist im folgenden Pipettierschema aufgezeigt:

Pipettierschema fuer ein 5-15 % Gradientengel

	5 % Trenngel	15 % Trenngel
H ₂ O	9,2 ml	4,8 ml
30 % Acrylamid	2,7 ml	8,0 ml
Trenngelpuffer (3,03 g Tris+ 80 ml H ₂ O, pH= 8,4/ HCl	3,0 ml	3,0 ml
Glycerin	1,0 ml	2 ml
40 % AMPS	50 µl	50 µl
TEMED	10 µl	10 µl

Um eine gleichmäßige Oberfläche zu erreichen, wurde das Trenngelgemisch mit Isopropanol überschichtet.

Anodenpuffer 100 mM Tris-HCl (pH=8,8)

Kathodenpuffer 100 mM Histidin (pH=8,0), 0,002 % Commassie G250

Probenpuffer A 100 mM Tris-HCl, pH= 8,0, 40 % Glycerin, 0,5 % Commassie G250

Probenpuffer B	62,5 µl 1 M Tris-HCl, pH=6,8
	10 µl 100 mM Na ₂ EDTA
	100 µl Glycerin (87 %)
	200 µl SDS (10 %)
	25 µl Bromphenolblau (0,25 %)
	552,5 µl H ₂ O
	50 µl 2-Mercaptoethanol

Die Proben wurden jeweils nach Aufnahme in den nicht denaturierenden Probenpuffer A bzw. in den denaturierenden Probenpuffer B gevortext und für 10 min bei 4 °C gelagert. Dabei wurden sowohl das Ausgangsmaterial als auch das Eluatmaterial jeweils in Puffer A und B aufgenommen und das Gel mit der entsprechenden Probe beladen. Der Gellauf wurde bei 4 °C und 20 V im Kühlraum durchgeführt. Die Gelelektrophorese war damit beendet, dass die blaue Lauffront unten angekommen war. Anschließend wurde das Gel in eine Entfärbelösung (s. 2.10.1) gelegt, bis der Hintergrund klar war und nur die Banden erkennbar waren. Das Gel wurde daraufhin in H₂O aufgewahrt und konnte im Folgenden wie die SDS-PAGE- Gele weiterverarbeitet werden (s. 2.11)

2.9 Zweidimensionale Gelelektrophorese

In der ersten Dimension, der **isoelektrischen Fokussierung (IEF)**, wird der amphotere Charakter von Proteinen ausgenutzt. Proteine können sowohl positive als auch negative Gruppen tragen. Es wird ein pH-Gradient erzeugt, an dem die Proteine im elektrischen Feld entlang wandern. Sobald sie den pH-Wert erreichen, der ihrem eigenen isoelektrischen Punkt entspricht, die Ladung des Proteins null ist, wandert das Protein nicht mehr.

Bei der **Herstellung der IEF-Strips** wurde zum Gießen der IEF-Strips 1,5 ml H₂O auf eine hydrophile Glasplatte gegeben.

Auf die Glasplatte wurde luftblasenfrei ein GelBond PAG film (GE Healthcare) gezogen. Das überschüssige Wasser wurde nach 5 min entfernt und die Schutzfolie abgezogen.

Auf die Folie wurde nun eine silikonisierte Glasplatte mit integrierter Gummidichtung an den Seiten gelegt und mit Klammern fixiert. 20 ml Acrylamidlösung (IEF-Lösung) wurden mit einer Schlauchpumpe langsam luftblasenfrei zwischen die Glaskammern gebracht. Danach wurde das Gel mit 70 %igem Isopropanol überschichtet und zunächst 60 min bei Raumtemperatur, anschließend 10 min bei 60 °C polymerisiert.

Nach der Entfernung der Glasplatten wurde das Gel mit der Folie zweimal für jeweils 10 min mit H₂O und einmal 15 min mit 2 %igem Glycerin gewaschen.

Das Gel wurde im Anschluss daran bei Raumtemperatur getrocknet und auf die gewünschte Stripgröße von 3 mm x 14,4 cm zugeschnitten.

IEF-Lösung:

Acrylamid-IEF-Stammlösung:

29,1 g Acrylamid-IEF

0,9 g Bisacrylamid

auf 100 ml mit H₂O auffüllen (filtrieren)

für ein 124 x 258 mm großes Gel:

4 ml Acrylamid-Stammlösung

16 ml H₂O

10 µl TEMED

20 µl (40 %) AMPS (40 mg AMPS in 1 ml H₂O)

Für die **Rehydratisierung der IEF-Strips** wurden je 300 µl der Gellösung für IEF-Strips in die Spuren des Reswelling Trays (GE-Healthcare) pipettiert, so dass keine Luftblasen gebildet wurden. Im nächsten Schritt wurde der Gelstrip mit der Acrylamidseite nach unten auf dieses Lösungsbett gelegt. Um zu verhindern, dass der Harnstoff auskristallisiert und zur Minimierung von Verdunstungserscheinungen wurde jede Spur mit 3 ml DryStrip Cover Fluid (GE Healthcare) überschichtet und über Nacht bei Raumtemperatur rehydratisiert.

Gellösung:

4,8 g Harnstoff

100 mg CHAPS

10 mg DTT

300 µl Servalyte 3-10

200 µl Ampholine 5-7

20 µl Bromphenolblau 2 %ig

auf 10 ml mit H₂O aufgefüllt

Für die Durchführung der IEF wurden eine Temperatur von 20 °C eingestellt. Die Multiphor wurde mit einer Wasserwaage ausgerichtet. Mithilfe einer Plastikpipette wurden 6-7 ml *Cover-Fluid* auf die Platte der *Multiphor* getropft und danach der Trog draufgesetzt. Der Ölfilm zwischen Platte und Trog wurde durch leichte Bewegungen gleichmäßig verteilt.

10 ml *Cover-Fluid* wurden in den Trog gegossen und gleichmäßig verteilt, so dass danach der *Dry-Strip-Aligner* mit der Wanne nach unten in den Trog gesetzt werden konnte. Ein Elektrodenstrip wurde in 2 etwa 11 cm lange Stücke geschnitten.

Die Elektroden-Strips wurden auf einer Glasplatte mit je 500 µl *Millipore* Wasser angefeuchtet. Die rehydratisierten Strips wurden vorsichtig mit der Pinzette aus dem *Reswelling Tray* entfernt, mit *Millipore* Wasser abgespült und mit der Gelseite noch oben auf Blotpapier gelegt. Die IEF-Strips wurden in die *Dry-Strip-Aligner* gelegt, wobei die Gelseite nach oben und das basische Ende nach vorne zeigte.

Die feuchten Elektroden-Strips wurden jeweils oben und unten quer über alle IEF-Strips gelegt, so dass die Gelenken etwa zur Hälfte berührt wurden.

Auf jeden Gelstreifen wurden bei der Anode 3 x 5 mm große Probeplättchen gelegt, die jeweils 10 µl Probelösung (ca. 100 µg Protein) enthielten (s. 2.5).

Die rote Kontaktklammer wurde oben rechts, die schwarze unten links aufgesteckt und die Strips vorsichtig mit 70 ml *Cover-Fluid* überschichtet. Die Deckel wurden aufgesetzt und die Kabel verbunden. Die Stromversorgung *EPS 3501* wurde folgendermaßen programmiert:

U/ V	I/ mA	P/ W	t/ min
2000	1	2	60
2000	2	2	165
2500	2	3	15

Nach Beendigung der Fokussierung wurde die Stromversorgung abgeschaltet, die Strips unabgespült in 15 ml-Tubes überführt und bei -80°C gelagert.

Für die **Rehydratisierung der IPG-Strips** wurden Strips (Immobiline Dry Strip, pH=3-10, NL, GE Healthcare) der Länge von 13 cm verwendet, die eine Quellfähigkeit von 250 μl Lösung/ Streifen aufwiesen. Pro Strip wurden ca. 300 μg Protein in 250 μl Probenpuffer (s. 2.6.3) aufgenommen, 5 min gevortext und 1 min bei 20000 g zentrifugiert. Dieses Volumen wurde nicht überschritten, da frühere Studien gezeigt haben, dass bei Überschreitung der Aufnahmefähigkeit am ehesten große Moleküle in Flüssigkeitsresten zurückbleiben [92]. Bei den IPG-Strips wurde die In-Gel-Rehydratisierung durchgeführt, wobei die Probe bereits mit der Rehydratisierungslösung zu den Streifen gegeben wird [93].

Das Probenvolumen wurde gleichmäßig in den *Reswelling Tray* (GE Healthcare) pipettiert, damit keine Luftblasen entstanden. Die Schutzfolie der IPG-Strips wurde vom Anodenende her abgezogen und der Strip mit der Gelseite nach unten in den Reswelling- Tray gelegt. Jede Spur wurde mit 3 ml DryStrip Cover Fluid (GE Healthcare) überschichtet und bei Raumtemperatur für 24 h rehydratisiert, um eine vollständige Aufnahme der Probe durch die Streifen zu erreichen.

Für die **Durchführung der IEF mit IPG-Strips** wurden die Kühlung auf eine Temperatur von 20°C eingestellt. Die Multiphor wurde mit einer Wasserwaage ausgerichtet.

Mithilfe einer Plastikpipette wurden 6-7 ml *Cover-Fluid* auf die Platte der *Multiphor* getropft und danach der Trog draufgesetzt. Der Ölfilm zwischen Platte und Trog wurde durch leichte Bewegungen gleichmäßig verteilt.

10 ml Cover-Fluid wurden in den Trog gegossen und gleichmäßig verteilt, so dass danach der *Dry-Strip-Aligner* mit der Wanne nach unten in den Trog gesetzt werden konnte. Ein Elektrodenstrip wurde in 2 etwa 11 cm lange Stücke geschnitten.

Die Elektroden-Strips wurden auf einer Glasplatte mit je 500 µl *Millipore* Wasser angefeuchtet. Die rehydratisierten Strips wurden vorsichtig mit der Pinzette aus dem *Reswelling Tray* entfernt, mit *Millipore* Wasser abgespült und mit der Gelseite noch oben auf Blotpapier gelegt. Die IEF-Strips wurden in die *Dry-Strip-Aligner* gelegt, wobei die Gelseite nach oben und das basische Ende nach vorne zeigte. Die feuchten Elektroden-Strips wurden jeweils oben und unten quer über alle IEF-Strips gelegt, so dass die Gelenden etwa zur Hälfte berührt wurden. Der Ablauf der IEF war somit identisch zu den IEF-Strips, nur dass bei den IPGs keine Probelplättchen mit der Probelösung auf das Gel gelegt werden mussten. Hier waren die Proteine durch die Rehydratisierung in der Probelösung bereits vom Strip aufgenommen, wobei die Auftrennung nach isoelektrischem Punkt erst durch das Anlegen von Spannung begann.

Das Spannungsgerät wurde folgendermaßen eingestellt:

Schritt 1	0-100 V	5 mA	5 W	5 Stunden
Schritt 2	100-3500 V	5 mA	5 W	6 Stunden
Schritt 3	3500 V	5 mA	5 W	6 Stunden
----- ~32 kWh insgesamt)				

Nach Beendigung der Fokussierung wurde die Stromversorgung abgeschaltet, die Strips unabgespült in 15 ml-Tubes überführt und bei –80 °C gelagert.

Für die **zweite Dimension** wurden zur Vorbereitung der Gelelektrophorese sowohl die Acrylamid-Trenngele, der Laufpuffer (10-fach, s. 2.8.2) als auch der SDS-Äquilibrationpuffer am Tag vorher angesetzt:

Pipettierschema für 12, 5 %ige Acrylamid-Trenngele:

	2 Gele	3 Gele	4 Gele
Acrylamidlösung	33,3 ml	50,0 ml	66,6 ml
4x Trenngelpuffer	20,0 ml	30,0 ml	40,0 ml
Destilliertes Wasser	25,4 ml	38,2 ml	50,8 ml

10 % SDS (Zugabe nach Entgasen)	800 µl	1,2 ml	1,6 ml
10 % Ammoniumpersulfat	400 µl	600 µl	800 µl
TEMED	26, 4 µl	39,6 µl	52,8 µl
Totales Volumen	80 ml	120 ml	160 ml

Das Trenngel wurde mit 0,1 % SDS überschichtet, um eine gleichmäßige Oberfläche zu erreichen und zur gleichmäßigen Polymerisierung eine Nacht im Kühlraum gelagert.

Äquilibrierungspuffer (für 400 ml):

Trenngelpuffer 13, 4 ml
Harnstoff 144, 14 g
Glycerin 138 ml
SDS 16 g
Bromphenolblau ca. 60 µl Stammlösung
 +400 ml H₂O

Die vorbereitete Agaroselösung wurde im Wasserbad vorgeheizt, das Kryostat auf 25 °C eingeschaltet und die untere Elektrophoresekammer bis zur Hälfte mit Laufpuffer gefüllt.

Agaroselösung:

0,5 % Agarose (NA, Pharmacia) wurde in Elektrophoreselaufpuffer langsam bis knapp unter den Siedepunkt aufgeköcht und anschließend mit 2-3 Körnchen Bromphenolblau (Serva) vermischt.

Äquilibrierung der Strips:

Der Äquilibrierungspuffer wurde aufgetaut, um daraus folgende 2 Lösungen (Angaben für 2 Strips) herzustellen:

- a) In 50 ml Tube: 100 mg DTT in 10 ml Äquilibrierungspuffer
- b) In 50 ml Tube: 400 mg Jodacetamid in 10 ml Äquilibrierungspuffer

Die aufgetauten Strips wurden nicht abgespült und im gleichen Röhrchen mit der Plastikseite zur Wand zunächst 15 min in 5 ml DTT-Lösung auf dem Taumler vorsichtig äquilibriert. Die Proteine werden mit SDS beladen, so dass die Eigenladungen der Proteine effektiv überdeckt werden und anionische Mizellen mit einer konstanten Nettoladung pro Masseneinheit entstehen. Dabei entstehen gestreckte, mit SDS beladende Polypeptidketten, die Ellipsoide bilden. Es ergibt sich eine lineare Beziehung zwischen dem Logarithmus der jeweiligen Moleküldichte und den relativen Wanderungstrecken dieser SDS-Polypeptid-Mizellen [94]. Das DTT bewirkte eine zusätzliche Reduzierung der Proteine. Danach wurde das DTT entfernt, um ein vertikales „pointstreaking“ im Gel zu verhindern [95].

Es folgte die Äquilibration in 5 ml der Iodacetamid-Lösung für ebenfalls 15 min, wobei die Tubes mit Alufolie abgedunkelt wurden, um Lichtreaktionen durch das Iodacetamid zu vermeiden. Durch das Iodacetamid erfolgt eine Alkylierung der Thiol-Gruppen, um diese zu blockieren [96]. Nach Entfernung der Flüssigkeit wurden die Strips mit Laufpuffer abgespült. Das 0,1 % SDS wurde vom Gel abgegossen und die Geloberkante vorsichtig mit Laufpuffer abgespült. Der Strip wurde auf die Geloberkante gelegt, wobei die Gelseite des Strips zur vorderen Glasplatte, die Plastikseite des Strips zur Rückseite der Glasplatte zeigte. Dabei wurden die Strips vorsichtig mit einer Pinzette von oben nach unten auf das Gel gedrückt, um einen ausreichenden Kontakt zu gewährleisten.

Auf ein etwa 5 x 3 mm großes Markerplättchen wurde auf einer Glasplatte mit 8 µl Marker (Dual Color, Precision Protein Standard, BioRad) pipettiert und mit 8 µl Agarose fixiert. Das getrocknete Markerplättchen wurde neben dem sauren Stripende auf das Gel gelegt.

Das Gel wurde in die Pufferkammer gestellt, die untere und die obere Pufferkammer wurden mit Laufpuffer aufgefüllt und der Deckel aufgesetzt.

Die Stromversorgung wurde folgendermaßen voreingestellt: 1000 V, 100 W

Schritt 1:	15 mA für 1 Gel	(15 min)
	30 mA für 2 Gele	(15 min)
	60 mA für 4 Gele	(15 min)
Schritt 2:	110 mA für 1 Gel	(~1: 23 h)

110 mA für 2 Gele (~2: 43 h)

110 mA für 4 Gele (~5: 25 h)

Nach der Elektrophorese wurde die Position der Strips durch das Ausstanzen von Gelstückchen am Beginn und Ende des Strips markiert. Um Kontaminationen zu vermeiden wurden die Gele ausschließlich mit Handschuhen berührt.

2.10 Proteinfärbung

2.10.1 Proteinfärbung mit Commassie

Färbelösung: 0,2 % Commassie („Brillant Blue“ R250, Serva)
 50 % Methanol
 50 % H₂O

Entfärbelösung: 50 % Methanol
 6 % Essigsäure (100 %)
 50 % H₂O

Das Gel wurde in der Färbelösung 1 h bei Raumtemperatur auf einem Schüttler (CAT RM5) gefärbt. Das Entfärben des Gels erfolgte bei Raumtemperatur über Nacht ebenfalls auf einem Schüttler. Am nächsten Tag wurden die Gele in H₂O unter ständigem Schwenken gewaschen und danach eingescannt, um sie danach weiterverarbeiten zu können.

2.10.2 Massenspektrometrie (MS)-kompatible Silberfärbung

Bei dieser Silberfärbung ist entscheidend, dass sie nur wenig Formaldehyd-Vernetzung der Proteine verursacht und somit MS-kompatibel ist.

Die Gele wurden nach der 2D-SDS-Gelelektrophorese über Nacht in Fixierlösung inkubiert.

Am nächsten Tag wurden sie zweimal je 25 min in 50 % Ethanol gewaschen. Im nächsten Schritt erfolgte die Sensitivierung des Gels mit einer frisch angesetzten Sensitivilösung für 60 s. Die Gele wurden dreimalig für je 20 s mit H₂O gewaschen und anschließend für 20 min in der Färbelösung inkubiert.

Daraufhin fand ein dreimaliger Waschvorgang mit H₂O statt. Die 2D-SDS-PAGE-Gele wurden etwa 2-10 min mit Entwicklerlösung behandelt, bis die Spots sichtbar wurden.

Um die Färbung abzustellen, wurden die Gele für 20 s gewässert und danach für 10 min in Stopplösung inkubiert.

Die Gele wurden in H₂O bei 4 °C kühl aufbewahrt.

Fixierlösung: 500 ml Ethanol, 400 ml H₂O, 100 ml Essigsäure, 0,5 ml Formaldehyd (37 %ig)

Sensitivilösung: 0,1 g Na₂S₂O₃ x 5 H₂O (Merck) in 500 ml H₂O

Färbelösung: 0,4 g AgNO₃ in 200 ml H₂O, 150 µl Formaldehyd (37 %ig)

Entwicklerlösung: 15g Na₂CO₃, 1 mg Na₂S₂O₃ x 5 H₂O in 250 ml H₂O, 125 µl Formaldehyd (37 %ig)

Die Gele mit den angefärbten Spots wurden schließlich in der Densitometrie mithilfe eines Laser- Scanners abgebildet und standen danach für den tryptischen Verdau zur Verfügung.

2.11 Tryptischer Verdau von Proteinen im Gel

Mithilfe des Spot-Cutters wurden die Spots aus dem Gel herausgeschnitten und für den *in situ*-Verdau in die Eppendorf LoBind Gefäße (Eppendorf, Hamburg) überführt.

Es wurde 100 µl H₂O hinzugegeben, 10 min bei Raumtemperatur geschüttelt und der Überstand abgenommen. Dieser Vorgang wurde einmal wiederholt.

Im nächsten Schritt wurde das Gel mit 100 µl 50 mmol/L NH₄HCO₃/ACN (1:1) für 15 min gewaschen und der Überstand entfernt. Das Gelstück wurde mit 30 µl ACN für genau 60 s vollständig bedeckt, danach wurde das ACN entfernt. Daraufhin fand eine Rehydratisierung mit 50 µl 50 mmol/L NH₄HCO₃-Puffer statt.

Nach 5 min wurde das Gel erneut mit 50 µl ACN versetzt, weitere 15 min geschüttelt und der Überstand entfernt. Nach Zugaben von 50 µl ACN wurde das Gel in der Speed Vac getrocknet. Für die Trypsinbehandlung wurden 0,5 µg Trypsin (MS-gold grade, Roche, Mannheim) in 250 µl 25mmol/ L NH_4HCO_3 gelöst. Nach Zugabe von 50 µl der Trypsinlösung wurde das Gel zunächst bei Raumtemperatur für 10 min und anschließend über Nacht bei 37 °C inkubiert. Die Proben wurden mit 10 µl 1 % iger TFA versetzt und für 15 min im Ultraschallbad behandelt. Nach diesem Arbeitsschritt war die Probe mit den entstandenen Peptiden auf die massenspektrometrische Untersuchung vorbereitet.

2.12 Massenspektrometrie

Die Massenspektrometrie ist ein Verfahren, welches zum Messen des Masse-zu-Ladungs-Verhältnisses m/z von Teilchen dient. Es beruht auf der Erzeugung von Ionen, welche im Analysator in der Gasphase nach ihrem Masse-zu-Ladungsverhältnis getrennt und im Detektor entsprechend ihrer Flugzeit detektiert werden.

Dabei können anhand der Molekulargewichte der Peptide durch den Vergleich mit theoretischen Massen aus Datenbanken die Proteine identifiziert werden.

Zu den neuen „sanften“ Ionisierungsverfahren der Proteinanalytik werden zwei massenspektrometrische Techniken gezählt: MALDI-TOF-MS (**M**atrix-**a**ssisted-**L**aser-**D**esorption/**I**onisation-**T**ime-**o**f-**F**light-**M**ass-**S**pectrometry und ESI-MS (**E**lektro-**S**pray-**I**onisation-**M**ass-**S**pectrometry) [28, 97]. Beide Verfahren sind sehr schonend für das Analytmolekül und führen kaum zu Fragmentationen.

2.12.1 MALDI-TOF-MS (Matrix-assisted-Laser-Desorption/ Ionization-Time-of-Flight-Mass-Spektrometry)

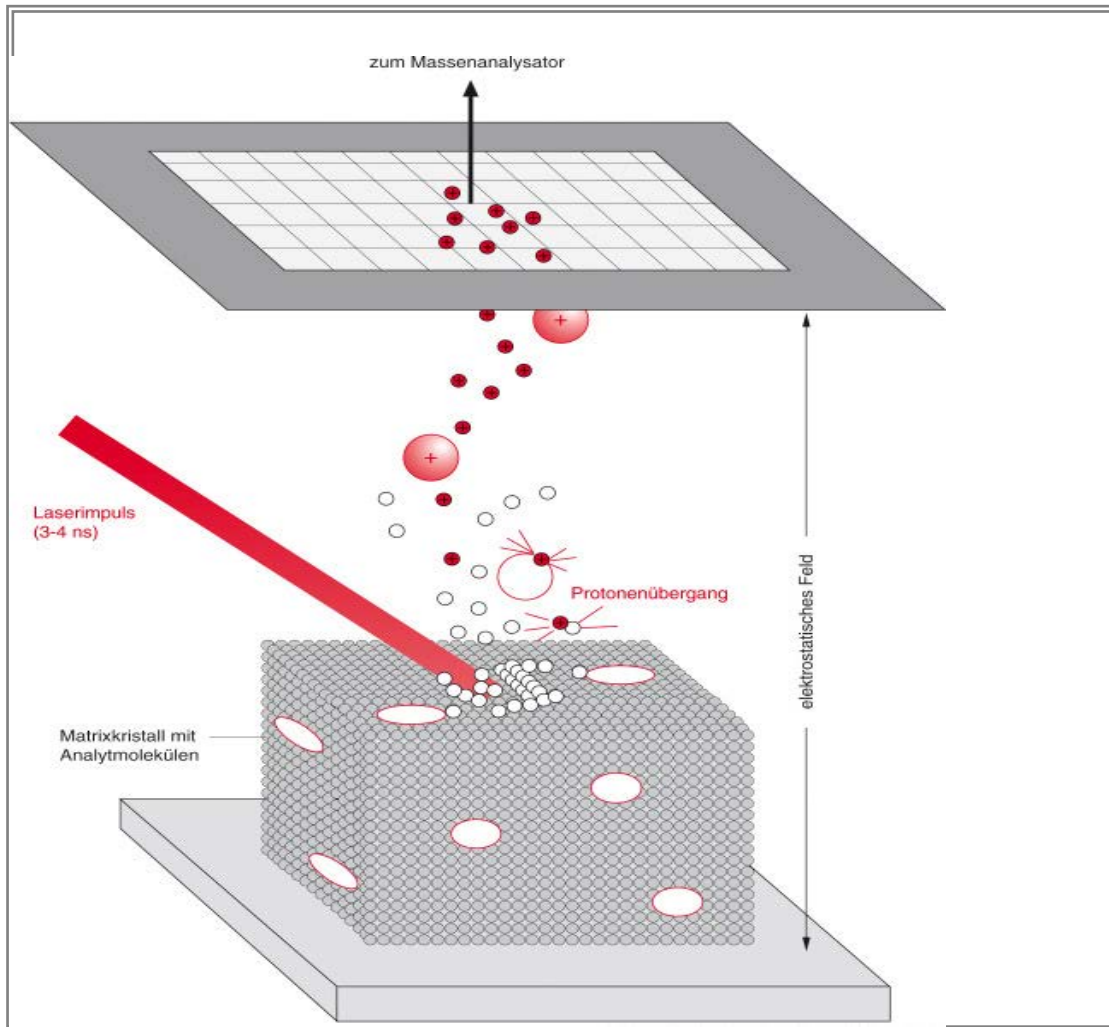


Abbildung 11 Schematische Darstellung des MALDI-Prozesses [98]

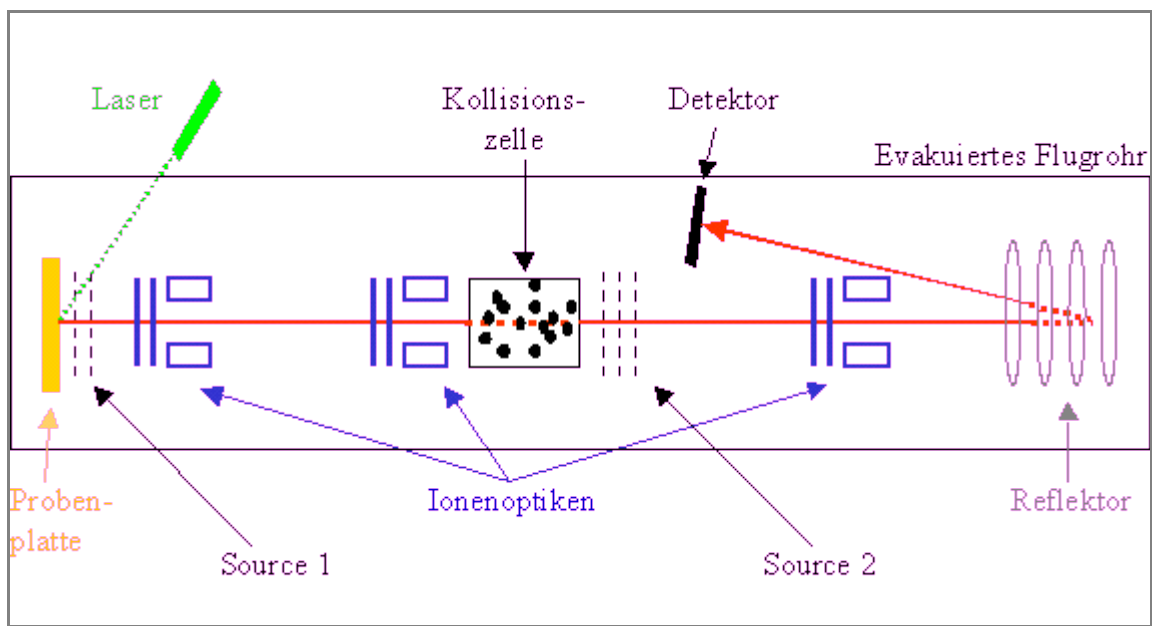


Abbildung 12 Schematische Darstellung eines MALDI-TOF-Massenspektrometers [98]

Das Verfahren der MALDI-TOF-MS besteht aus dem MALDI-MS mit angegliedertem Flugzeitanalysator (TOF-Time of Flight) (s. Abb.11, 12). Die Analysen wurden mit dem Ultraflex I TOF/ TOF Massenspektrometer (Bruker Daltonik, Bremen), welches mit einem Stickstofflaser und einer LIFT- MS/MS-Einheit ausgestattet ist, durchgeführt. Es wurde bei den Messungen ein positiver Reflektormodus angewendet. Durch das Trypsin wurden die Peptidbindungen des zu analysierenden Proteins C-terminal zu Lysin und Arginin gespalten. Die Proben wurden auf einem Probenhalter mit einer Matrix, die aus 2,5-Dihydroxybenzoesäure (Sigma) in 50 % ACN in 1 % Phosphorsäure bestand, kokristallisiert [99]. Diese Kokristallisierung erfolgte bei einem 10^3 - 10^4 -fachen Matrixüberschuss. Die Matrix bestand aus kleinen organischen Molekülen, die bei der verwendeten Laserwellenlänge von 377 nm die Energie stark absorbierten. Durch kurze, hochenergetische Laserpulse kam es durch eine Protonenübertragung von Matrixmolekülen auf die Peptide zur Bildung von Peptidionen und zur Überführung in die Gasphase [100-101]. Diese wurden im elektrischen Feld beschleunigt und flogen dann durch die feldfreie Driftzone zum Detektor. Die benötigte Flugzeit der einzelnen Ionen als Maß für deren Masse/Ladungsverhältnis wurde gemessen, so dass danach die Masse der erzeugten Peptidionen bestimmt werden konnte. Da die Ionen nach der Beschleunigungsphase nahezu alle die gleiche kinetische Energie aufwiesen, war die Flugzeit der Ionen mit kleinem m/z -Quotienten kürzer als derer mit großem m/z -

Quotienten. Es wurde mit einem Peptid- (Kalibrierungs)-Standard (~1000-4000 Da) von Bruker Daltonik kalibriert.

Bei den Messungen wurden jeweils 200-400 Einzelspektren addiert, um sie daraufhin mit dem Programm Compass 1.1 Software, basierend auf den Programmen FlexAnalysis 2.4 und BioTools 3.0 (Bruker), auszuwerten. Die Identifizierung der Proteine erfolgte mit Hilfe der Mascot Suchmaschine (www.matrixscience.com) und der MSDB Datenbank.

Die Suche wurde auf die Taxonomie *C. elegans* mit einer Massentoleranz von 100 ppm und Carbamidomethylierung von Cystein als globale Modifikation und einer Oxidation von Methionin als variable Modifikation beschränkt. Ab einem Mowse Score von größer als 58 wurden die Proteine als identifiziert betrachtet. Weiterführende Details wie der isoelektrische Punkt, die Lokalisation und die Funktion der identifizierten Proteine wurden mithilfe von Wormbase (www.wormbase.org) und Uniprot (www.uniprot.org) ermittelt.

2.12.2 ESI-MS (Elektrospray-Ionizations-Mass-Spektrometry)

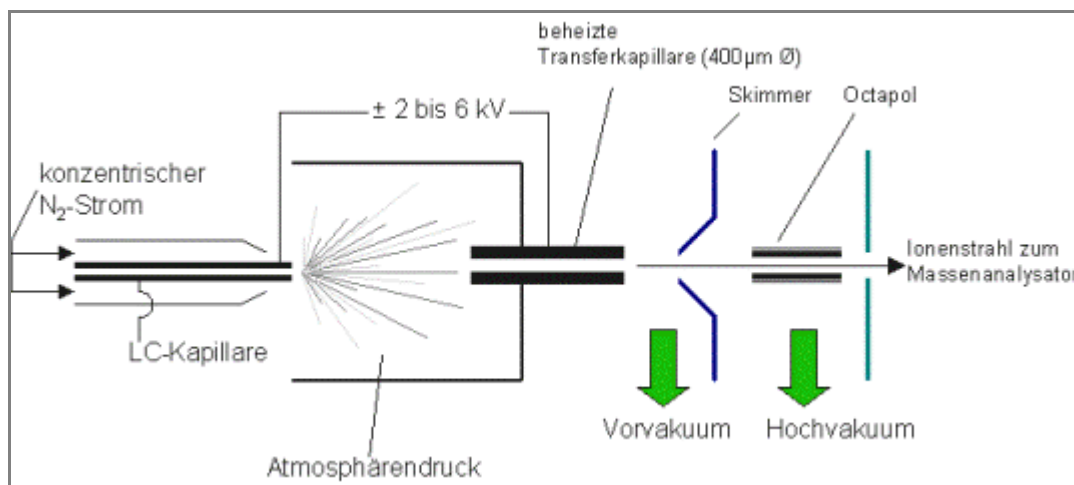


Abbildung 13 Schematische Darstellung der Elektro-Spray-Ionization [102]

Als Vorbereitung auf die ESI-MS wurden die Proteinbanden nach Sevchenko [103] im Gel verdaut. Die eluierten Peptide wurden mittels C18 ZipTips aufkonzentriert und mit 20 µl 80 % Acetonitril in 0.5 % Essigsäure eluiert. Im nächsten Schritt wurde das Volumen in der SpeedVac auf 5 µl konzentriert und mit 5 µl 2 % Acetonitril (1% TFA) angesäuert.

Die Trennung der Peptide erfolgte auf einer Agilent 1200 nanoflow HPLC-Anlage [104], s. Abb. 13). Unter konstantem Fluss von 500 nl/min wurden 5 µl der Probe auf eine 15cm Säule

(75 µl ID) mit Ermittler (Proxeon Biosystems) aufgetragen. Das Säulenmaterial bestand aus ReproSil-Pur C 18-AQ Material (3 µm; Dr. Maisch GmbH). Die Peptide wurden bei einer Durchflussrate von 200 nl/min und einem linearen Gradienten von 10-60% Acetonitril über 105 min eluiert. Das HPLC-System und das LTQ-Massenspektrometer (ThermoFisher Scientific) waren über ein „nanoscale“- LC-Interface (Proxeon Biosystems) miteinander verbunden. Es wurden Übersichtsspektren von m/z 300-1700 aufgenommen. Für die MS/MS-Fragmentierungen wurden die fünf intensivsten Ionen ausgewählt. Mithilfe der Xcalibur Software erfolgte die Datenaquisition, während die Daten gegen die NCBI nr Datenbank gesucht wurden.

3 ERGEBNISSE

Die Methode der Identifizierung von PC-bindenden Proteinen von *C. elegans* setzt die Kombination einzelner Arbeitsschritte der Proteinanalytik voraus (s. Abb.14). Die gesuchten Proteine wurden aus dem Probenmaterial extrahiert und mithilfe der Affinitätschromatographie isoliert. Nach der Auftrennung der Proteine über die 1-oder die 2-D-Gelelektrophorese wurden die Proteinspots ausgeschnitten und proteolytisch verdaut. Die resultierenden Peptide wurden mithilfe der Massenspektrometrie analysiert. Die Identifikation und die zelluläre Lokalisation der Proteine erfolgte anhand von Datenbanken.

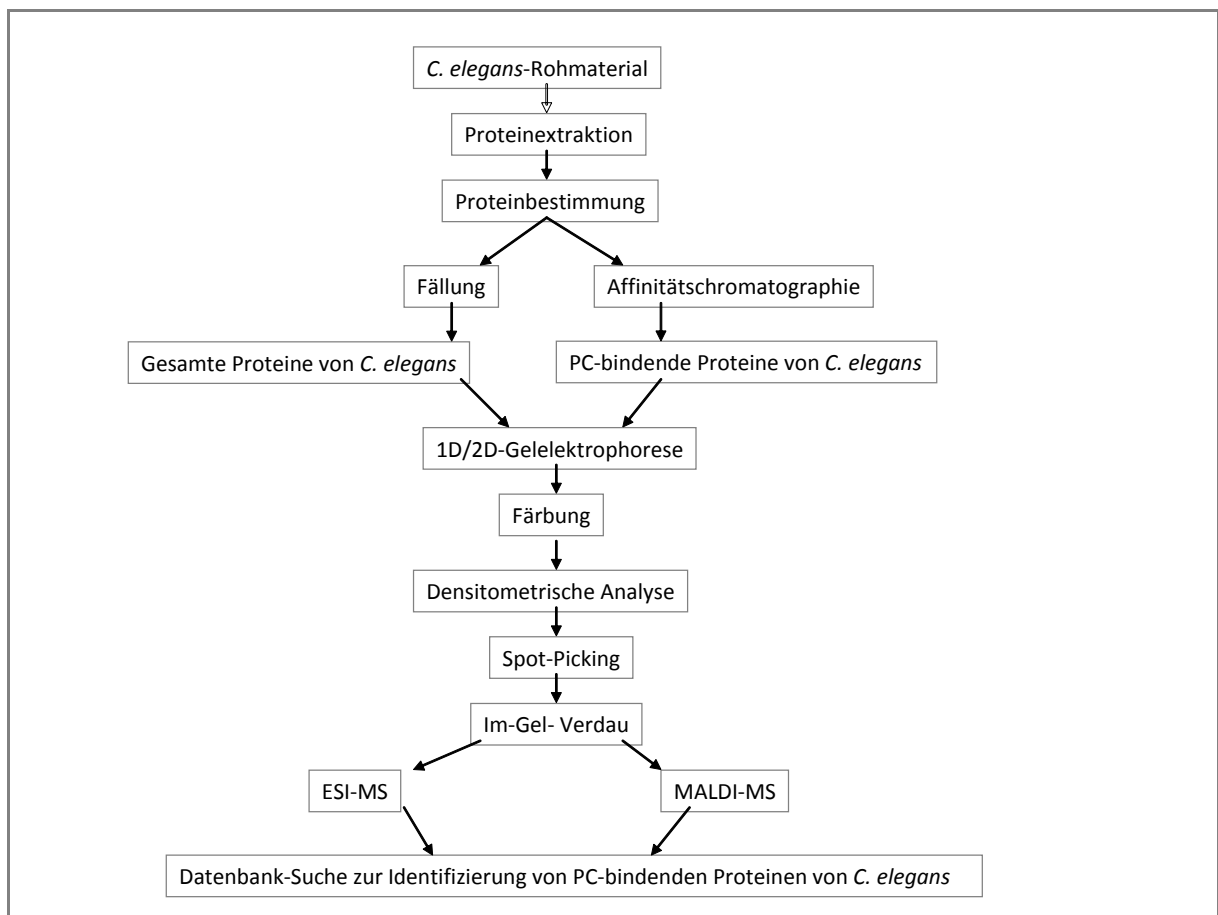


Abbildung 14 Schema zur Identifizierung von PC-bindenden Proteinen

Es zeigte sich, dass die Ergebnisse und die Reproduzierbarkeit der Methode stark von den Bedingungen der Extraktionsmethode und der 2D-Gelelektrophorese, unter denen diese durchgeführt wurden, abhängig waren. Daraus ergab sich die Notwendigkeit, dass eine

Optimierung der einzelnen Schritte notwendig war. In dieser Arbeit dienten als Orientierung Hinweise der jeweiligen Hersteller bzw. Vorschriften aus der aufgeführten Literatur. Zur Optimierung der Methode wurden verschiedene Parameter zur Verbesserung der Ergebnisse getestet und anschließend miteinander verglichen. Eigene Erfahrungen führten zur Anpassung der Methode an die Fragestellung dieser Arbeit.

3.1 Optimierung und Etablierung der Extraktions-und Probenvorbereitung

3.1.1 Optimierung der *C. elegans*- Extraktion

Die lyophilisierten Würmer (s. 2.2-2.5) wurden mit Lysispuffern (s. 2.4) behandelt. Dabei wurden zum Vergleich drei verschiedene Lysispuffer verwendet: ein Tris-Lysispuffer und die in der Arbeitsgemeinschaft standardmäßig verwendeten Lysispuffer mit CHAPS bzw. ohne CHAPS.

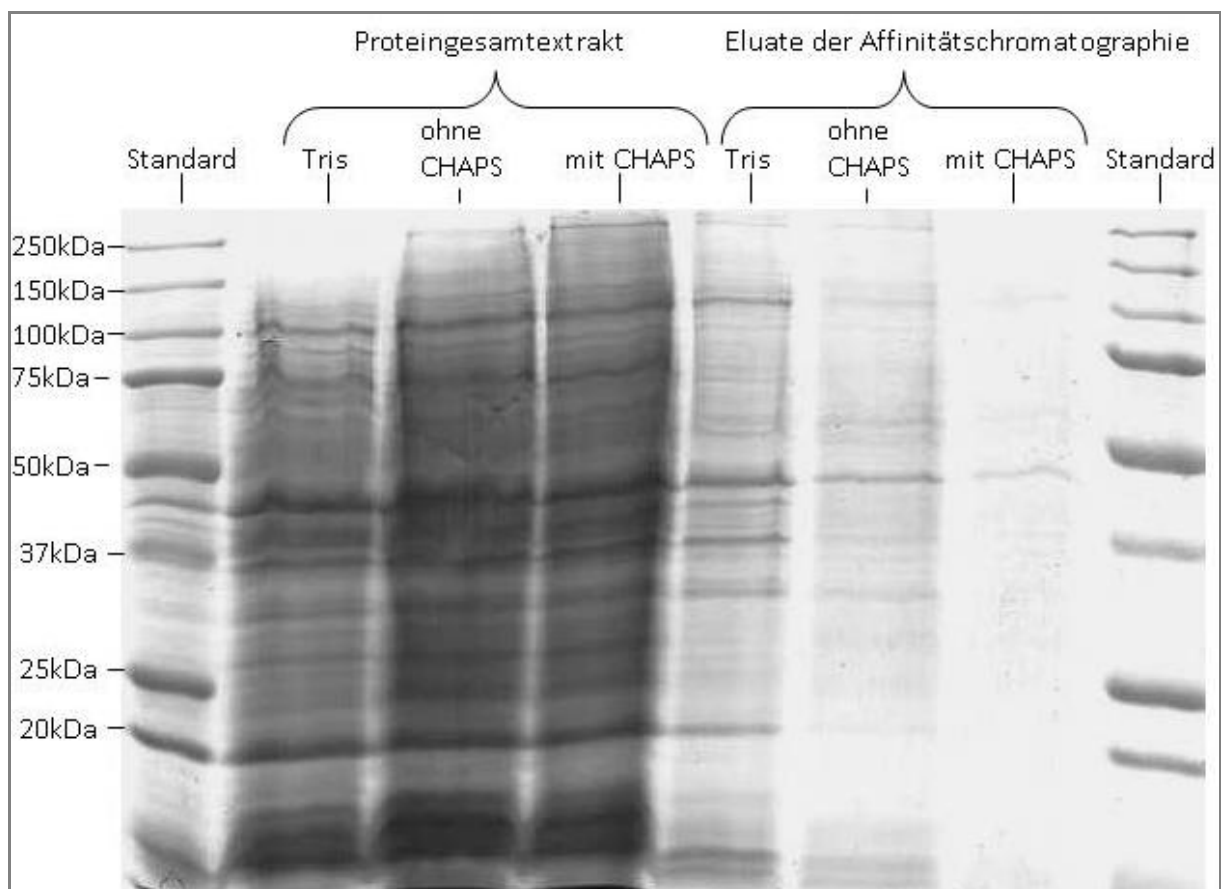


Abbildung 15 Silbergefärbtes 1D-SDS-PAGE-Gel der Rohextrakte bzw. Eluate der Affinitätschromatographie von *C. elegans* aus drei verschiedenen Extraktionen

Nach Aufnahme von jeweils 50 mg *C. elegans*- Material in jeweils 1500 µl Lysispuffer in insgesamt 5 Durchgängen (s. 2.4) zeigte sich die beste Löslichkeit im Tris-Lysispuffer. In allen drei Lysispuffern war Vortexen allein nicht ausreichend, um genügend Protein in Lösung zu bringen. Es fand daher in allen Puffern eine Behandlung der Proben im Ultraschallbad für

jeweils 5 min statt. Darüber hinaus wurden diese Proben zusätzlich für jeweils 3x 20 s mit dem Ultraschallstab weiterbehandelt.

Während im Tris-Puffer ausreichend Protein in Lösung gebracht werden konnte, gelang dies im Puffer mit CHAPS und im Puffer ohne CHAPS trotz mehrfacher Behandlung mit dem Ultraschallstab nicht zufriedenstellend. Die Behandlungsdauer von 20 mit dem Ultraschallstab wurde absichtlich nicht überschritten, um ein zu starkes Erhitzen der Probe und eine Modifizierung von Proteinen durch den Harnstoff bei höheren Temperaturen zu vermeiden. Eine anschließend durchgeführte Proteinbestimmung (s. 2.5) ergab, dass nach Behandlung des *C. elegans*- Rohmaterials im gleichen Puffervolumen die höchste Proteinmenge im Tris- Lysispuffer gemessen wurde: In jeweils 1 µl Volumen wurden im Tris-Lysispuffer 10,66 µg Protein, im Lysispuffer ohne CHAPS 5,33 µg Protein und im Lysispuffer mit CHAPS 7,1 µg Protein nachgewiesen. Es zeigten sich im 1D-SDS-PAGE nach dem Auftragen von jeweils 20 µl Probenlösung bei allen drei Extraktproben vergleichbare Bandenmuster, während dies bei den Eluatproben am deutlichsten bei der mit Tris-Lysispuffer behandelten Proben (s. Abb. 15) ausgeprägt war. Die 2D-Gele der drei unterschiedlich lysierten Proben wurden ebenfalls miteinander verglichen. Dabei stellten sich trotz gleicher aufgetragener Proteinmenge die resultierenden Spots der im Tris-Puffer behandelten Probe am deutlichsten (s. Abb. 16-18) dar. Aufgrund der besseren Löslichkeit des *C. elegans*-Materials im Tris-Puffer, der höheren Proteinmenge bei der Proteinbestimmung und den dargestellten Gelergebnissen bei den 1D- als auch 2D-Gelen wurde im Folgenden zur Lyse standardmäßig der Tris-Lysispuffer verwendet.

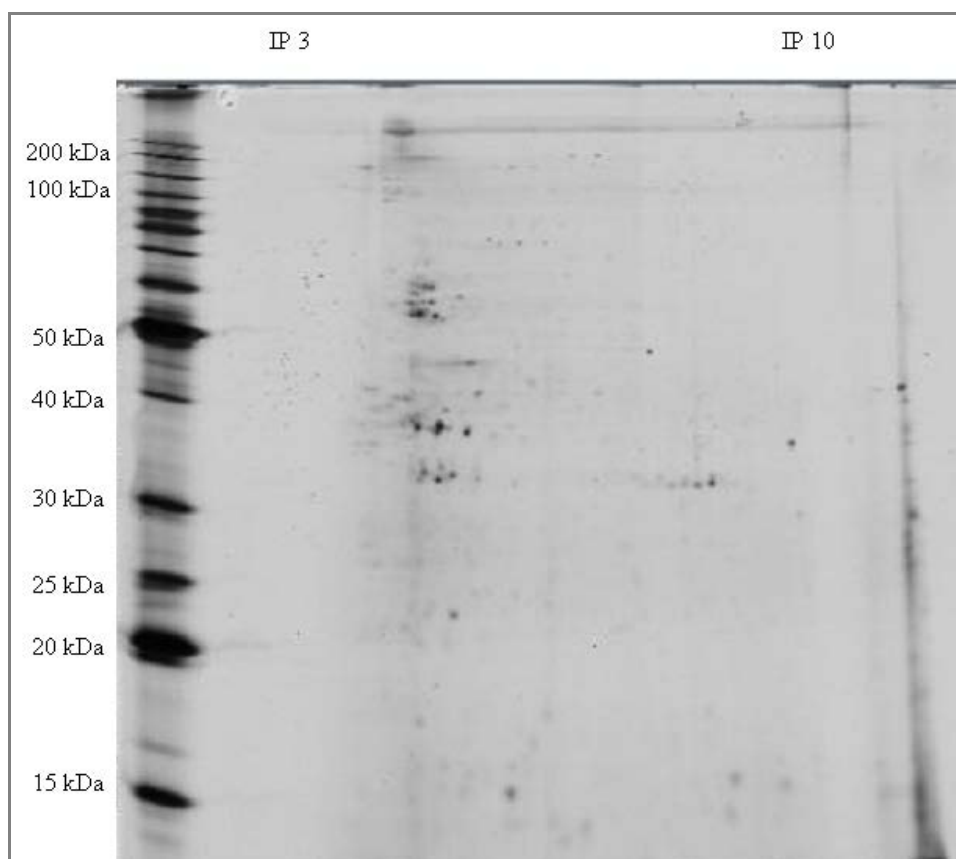


Abbildung 16 2D-Gel des Eluates der Affinitätschromatographie von *C. elegans* nach Extraktion mit Tris-Lysispuffer und Silberfärbung

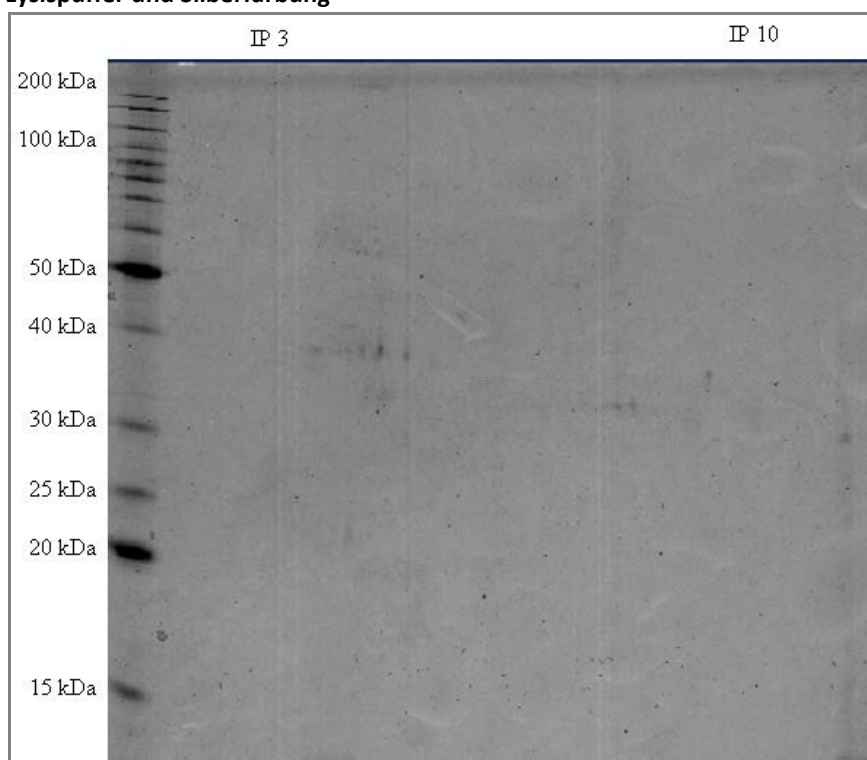


Abbildung 17 2D-Gel des Eluates der Affinitätschromatographie von *C. elegans* nach Extraktion mit Lysispuffer mit CHAPS und Silberfärbung

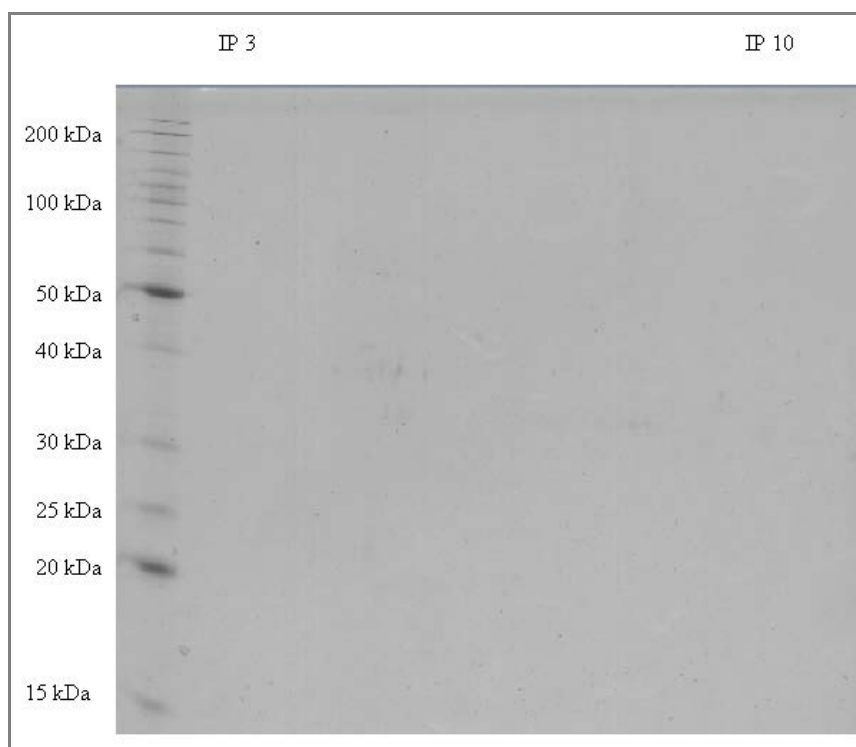


Abbildung 18 2D-Gel des Eluates der Affinitätschromatographie von *C. elegans* nach Extraktion mit Lysipuffer ohne CHAPS und Silberfärbung

3.1.2 Optimierung der Fällung des *C. elegans*- Materials

Eine direkte Verwendung des Extraktes bzw. des Eluates zur Durchführung der IEF war in der Regel wegen zu geringer Proteinkonzentrationen nicht möglich. Ohne die Fällung und Ankonzentrierung des Materials wurde die isoelektrische Fokussierung zudem durch Salze und kleinmolekulare Verbindungen gestört, was während der Methodenetablierung zum Durchbrennen der Strips oder auf den SDS-PAGE-Gelen zu störenden Salzspuren führte.

Ein Teil der unterschiedlich extrahierten Proben wurde direkt mithilfe der Affinitätschromatographie weiterverarbeitet (s. 2.6). Die Eluate der Affinitätschromatographie wurden lyophilisiert und zur Entfernung von Lipiden und niedermolekularen Verbindungen sowie zur Aufkonzentrierung der Probe einer Methanol-Chloroform- als auch einer Aceton-Fällung (s. 2.7) unterworfen.

Nach 2-dimensionaler Gelelektrophorese (s. 2.9) und Silberfärbung (s. 2.10.2) wurden die resultierenden Gele hinsichtlich des Spotmusters verglichen. Dabei stellten sich die einzelnen Proteinspots im 2D-SDS-PAGE nach Methanol-Chloroform-Fällung deutlicher erkennbar sowie leichter voneinander abgrenzbar dar und zeigten eine bessere Auflösung

des Spotmusters. Zudem zeigten die Spots im mit Methanol-Chloroform-gefällten Gel eine höhere densitometrische Dichte (s. Abb. 19). Das mit Aceton gefällte Gel zeigte horizontal viele Salzspuren auf, welche die Visualisierung und somit die Qualität der Spots beeinträchtigten (s. Abb. 20). Vor allem im basischen Bereich wurden die Proteine aus der Aectonfällung unzureichend fokussiert und einige Bereiche stellten sich sogar als proteinfrei dar.

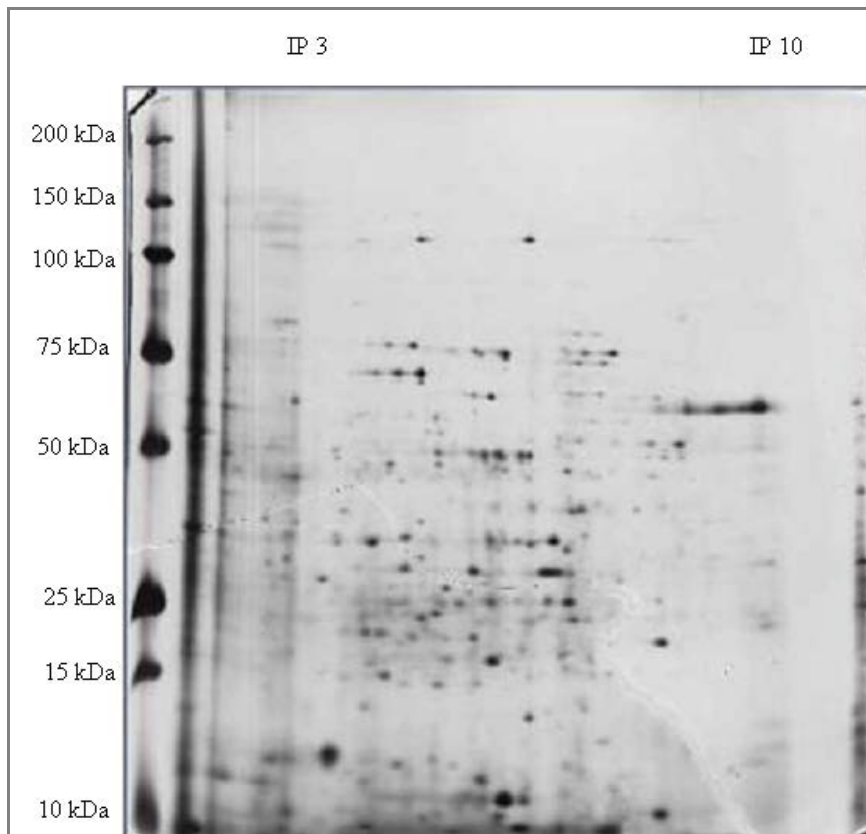


Abbildung 19 Auftrennung der *C. elegans*- Proteine aus dem Gesamtextrakt nach Methanol-Chloroformfällung durch 2D-Gelelektrophorese. Das Gel wurde mit Silber gefärbt

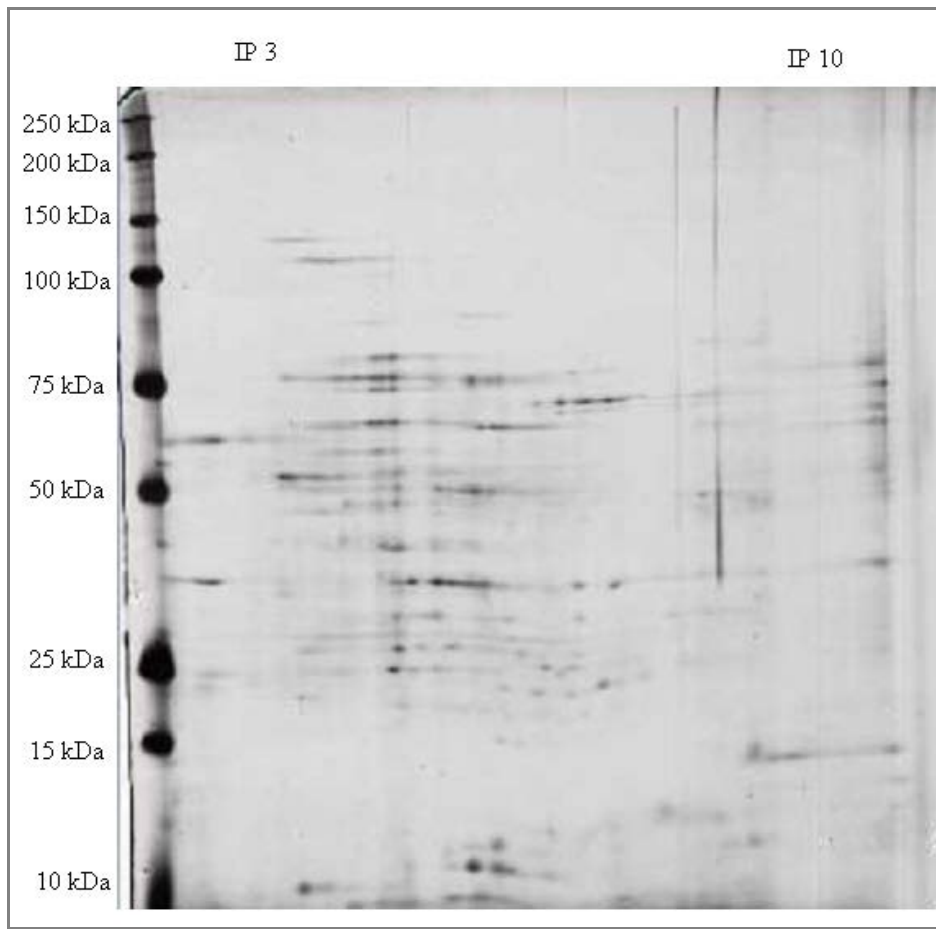


Abbildung 20 Auftrennung der *C. elegans*- Proteine aus dem Gesamtextrakt nach Acetonfällung durch 2D-Gelelektrophorese. Das Gel wurde mit Silber gefärbt.

3.1.3 Optimierung der isoelektrischen Fokussierung

Das lyophilisierte *C. elegans*-Material wurden mit Tris-Lysispuffer extrahiert und zentrifugiert (s. 2.4). Nach Durchführung der Affinitätschromatographie wurden die Eluate zur Elimination von Lipiden und niedermolekularen Verbindungen sowie zur Ankonzentrierung der *C. elegans*-Proteine Methanol-Chloroform-gefällt (s. 2.7.3). Vergleichend wurden die Proteine in der IEF entweder auf kommerziellen IPG-Strips oder auf selbst hergestellten IEF-Strips getrennt. Durch die Verwendung von Servalyte 3-10 wurde der pH-Bereich bei den selbsthergestellten IEF-Strips auf pH 3-10 angepasst, was dem pH-Bereich der kommerziellen IPG Strips (s. 2.9.1.4) entsprach. Bei der Rehydratisierung der Strips wurde bei den IEF-Strips die Probe als sogenanntes Cup-loading erst bei der isoelektrischen Fokussierung auf das Gel gebracht (s. 2.9.1.3), während bei den IPGs die sogenannte in-Gel-Rehydratisierung durchgeführt wurde, bei der die IPG-Strip in der Probe rehydratisiert wurden (s. 2.9.1.4). Die

durch 2D-Gelelektrophorese aufgetrennten Proteine wurden durch Silberfärbung detektiert (s. 2.10.2). Die korrespondierenden Spots wurden mit dem Spot-Cutter aus dem Gel geschnitten und tryptisch verdaut (s. 2.11). Die Proteine konnten danach mithilfe des MALDI-TOF-MS Peptide Mass Fingerprints und der MASCOT Datenbanksuche identifiziert werden (s. 2.12.1). Dabei zeigte sich bei der aufgetragenen Proteinmengen von 300 µg pro Strip eine höhere Anzahl an Spots bei Verwendung der gekauften IPG-Strips (s. Abb. 21,22). Im Folgenden wurden für die 2D-SDS-PAGE gekaufte IPG-Strips verwendet, da sie eine höhere Beladung mit Proteinen erlauben. Qualitativ zeigten die selbstergestellten IEF-Strips gegenüber den gekauften IPG-Strips keine Nachteile.

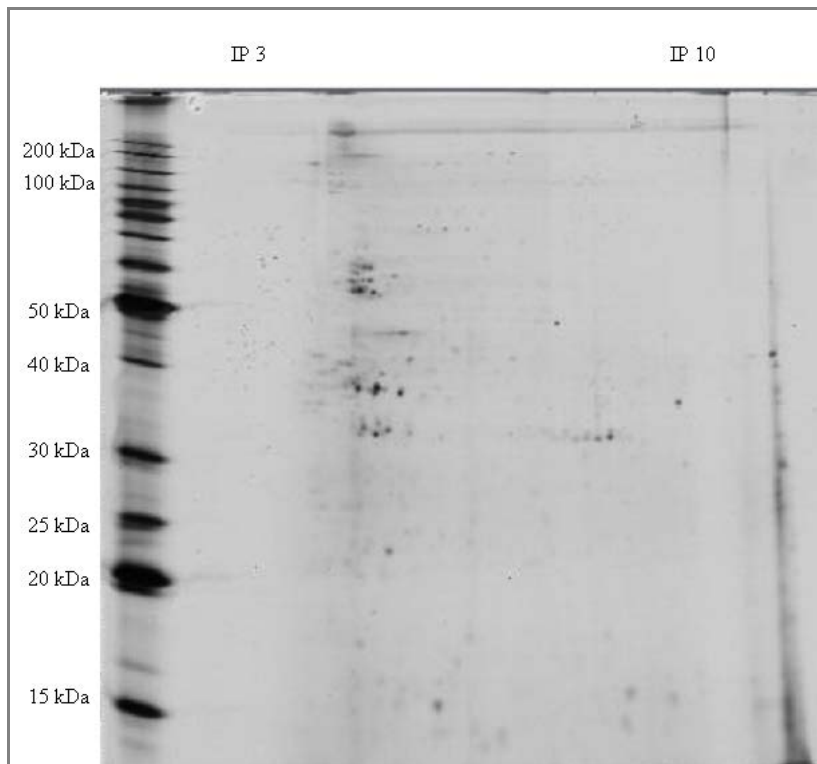


Abbildung 21 Trennung der *C. elegans*- Proteine des Eluatmaterials auf kommerziellen IPG-Strips und 2D-Gelelektrophorese. Die Probe wurde Methanol-Chloroform gefällt und das Gel mit Silber gefärbt

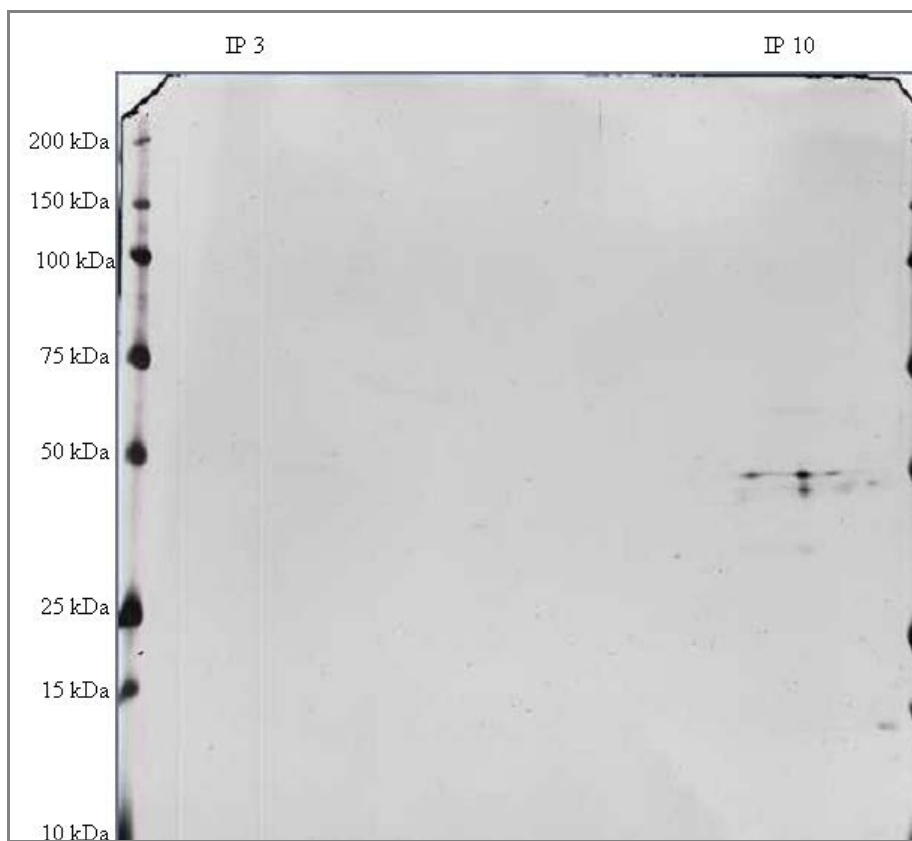


Abbildung 22 Trennung der *C. elegans*- Proteinen des Eluatmaterials auf selbsthergestellten IEF-Strips und 2D-Gelelektrophorese. Die Probe wurde Methanol-Chloroform gefällt und das Gel mit Silber gefärbt

3.1.4 Optimierung der Färbung der Gele

Nach der Auftrennung der Proteine durch die 1D/2D-Gelelektrophorese wurden die Gele gefärbt, um die Spots zu detektieren. Dabei wurden die einfache Commassie-Blue-Färbung (s. 2.10.1) und die Silberfärbung (s. 2.10.2) vergleichend getestet. Es konnte mit der Commassie-Färbung im Vergleich zur Silberfärbung eine schlechtere Anfärbbarkeit der Gele beobachtet werden. Zudem wurden abhängig von der gewählten Färbemethode Einflüsse auf die Struktur des 2D-Musters der zu untersuchenden Proteinprobe beobachtet. Dies ist auf die unterschiedliche Affinität des jeweiligen Proteins zum verwendeten Farbstoff zurückzuführen [94]. Da nach unterschiedlichen Methoden gefärbte Gele aus diesem Grund nicht vergleichbar waren, wurden alle produzierten 2D-Gele zunächst mit Commassie und anschließend mit Silber gefärbt. Dieser Ablauf erklärte sich dadurch, dass die Commassie-Färbung vergleichsweise mit weniger Arbeitsschritten verbunden war und deshalb von Beginn an favorisiert und angewendet wurde. Aufgrund der dabei nicht zufriedenstellenden

Visualisierung an Spots wurde die Silberfärbung mit der höheren Sensitivität angefügt und dieser Ablauf auf die anderen Gele übertragen, um sie so vergleichen zu können. Die Äquilibrierungszeit in der Entwicklerlösung bei der Silberfärbung (s. 2.10.2) variierte bei den einzelnen Gelen zwischen 3-15 min, so dass die Stopplösung individuell, vom Gel abhängig, hinzugeben wurde.

3.2 Etablierung der Affinitätschromatographie

Die Eignung des Säulenmaterials zur Anreicherung PC-bindender Proteine wurde zunächst mithilfe von C-reaktivem Protein (CRP) und TEPC-15 untersucht.

3.2.1 Affinitätschromatographie mit CRP

In früheren Studien konnte bereits die Affinität des Akute-Phase-Proteins CRP an PC gezeigt werden [105]. Die Literatur des Herstellers (Pierce) zur Affinitätschromatographie bezieht sich ebenfalls auf das CRP [106], so dass es in dieser Arbeit zur Überprüfung des Säulenmaterials eingesetzt wurde. Dabei wurde die Bindungseigenschaft zwischen dem *p*-Aminophenyl-Phosphorylcholin-haltigen Säulenmaterial als Matrix und CRP als Ligand überprüft (s. 2.6).

Aufgrund der calciumabhängigen Bindung zwischen CRP und PC [105] wurden für die Äquilibration der Säule die calciumhaltigen Puffer A und B (s. 2.6) verwendet. Die Bindung konnte anschließend mit dem im Elutionspuffer (s. 2.6) enthaltenen EDTA durch die Komplexbildung des Calciums aufgehoben werden [107-108]. Das Eluat wurde anschließend auf eine Nap-Säule aufgetragen, um die Probe zu entsalzen (s. 2.8.1).

Die Proben wurden lyophilisiert und anschließend für die Gelelektrophorese in die Probenpuffer A und B (s. 2.8.3) aufgenommen. Durch die Aufnahme in zwei verschiedene Probenpuffer mit nicht-denaturierenden (Puffer A) bzw. denaturierenden Eigenschaften (Puffer B) sollten die resultierenden Bandenmuster beim Ausgangsmaterial und Eluat (s. Abb. 23) miteinander verglichen werden. Sowohl das CRP-Ausgangsmaterial als auch das CRP-Eluat der Affinitätschromatographie wurden in die Geltaschen eines nativen 1D-Gradientengels aufgetragen. Das Gel wurde mit Commassie gefärbt (s. 2.10.1), um die Banden sichtbar zu machen. Dabei zeigten sich beim Ausgangsmaterial die deutlichsten

Banden im nicht denaturierenden Probenpuffer A (s. Abb. 23 A), bei der Eluatprobe jedoch im Puffer B mit den denaturierenden Eigenschaften (s. Abb. 23 D). Die resultierenden Banden wurden aus dem gefärbten Gel ausgeschnitten und tryptisch verdaut (s. 2.11). Anschließend wurden die Proteinbanden mithilfe von MALDI-TOF-MS Peptide Mass Fingerprint und MASCOT Datenbanksuche analysiert (s. Abb. 24, 25).

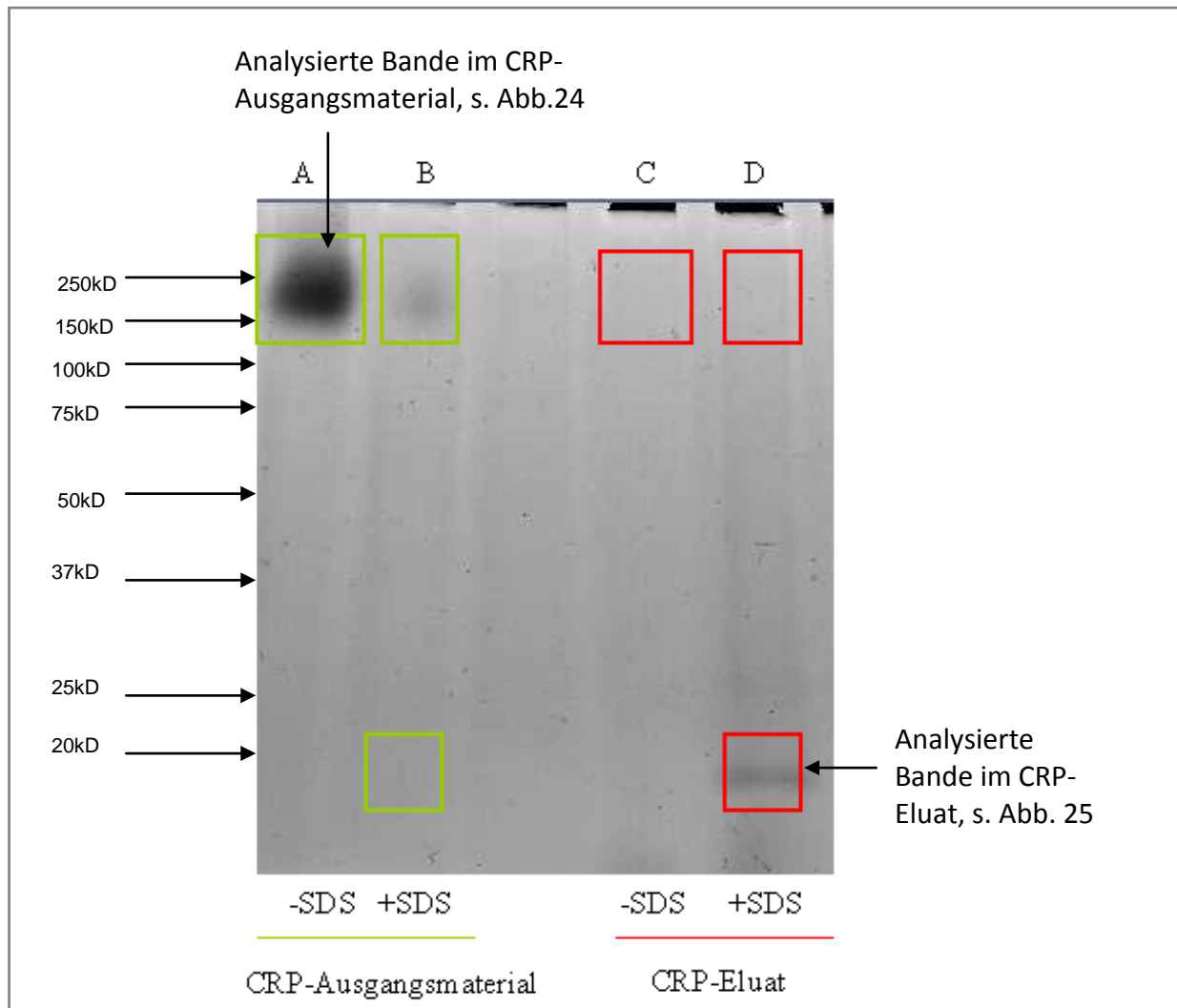
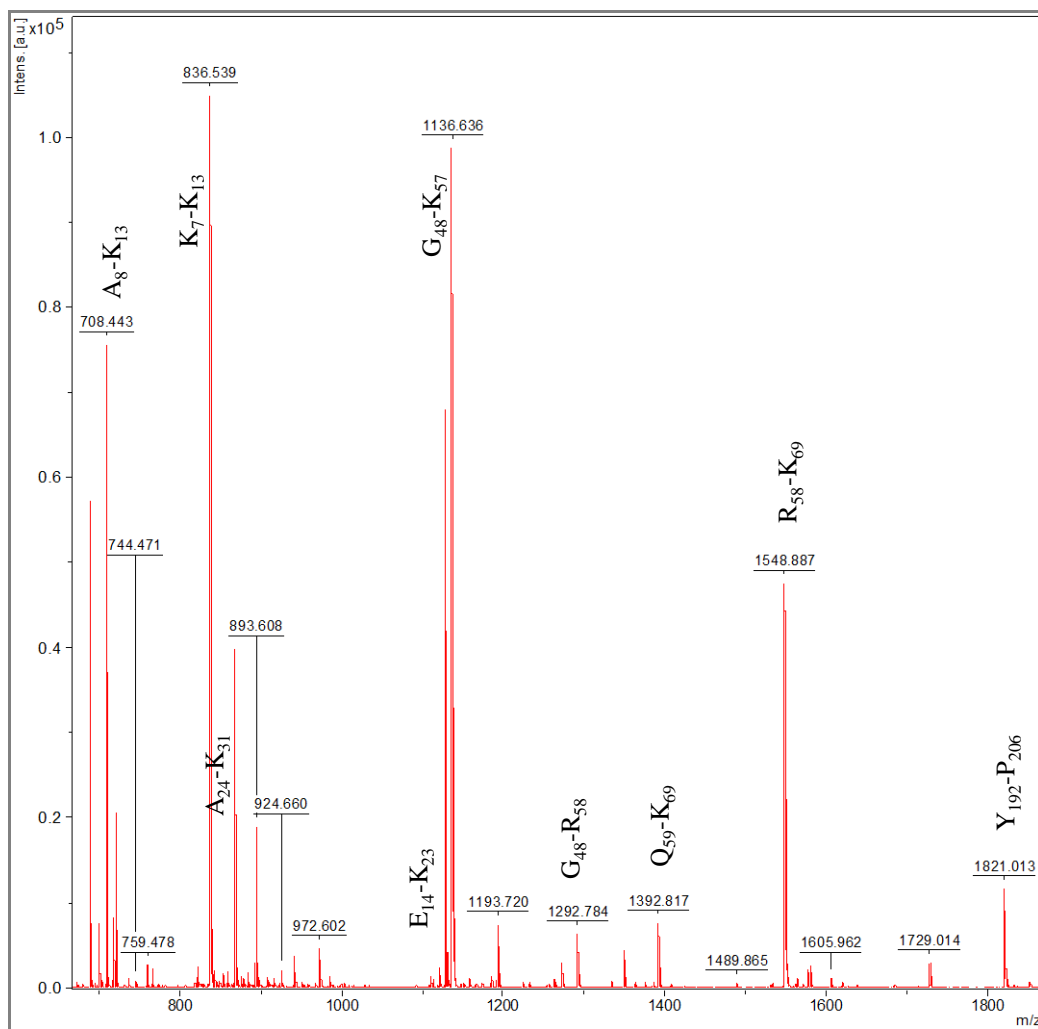
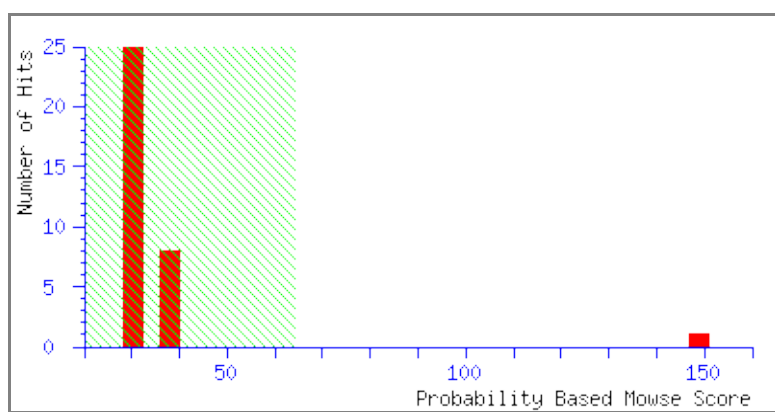


Abbildung 23 1D-Gradientengel des CRP-Ausgangsmaterials und des Eluats der Affinitätschromatographie.

(A) Ausgangsmaterial in Puffer A, (B) Ausgangsmaterial in Puffer B, (C) Eluat in Puffer A, (D) Eluat in Puffer B, Coomassie-Färbung

A**B**

C

1 QTDMSRKAFV FPKESDTSYV SLKAPLTKPL KAFTVCLHFY TELSSTRGYS

51 IFSYATKRQD NEILIFWSKD IGYSFTVGGS EILFEVPEVT VAPVHICTSW

101 ESASGIVEFW VDGKPRVRKS LKKGYTVGAE ASIILGQEQD SFGGNFEGSQ

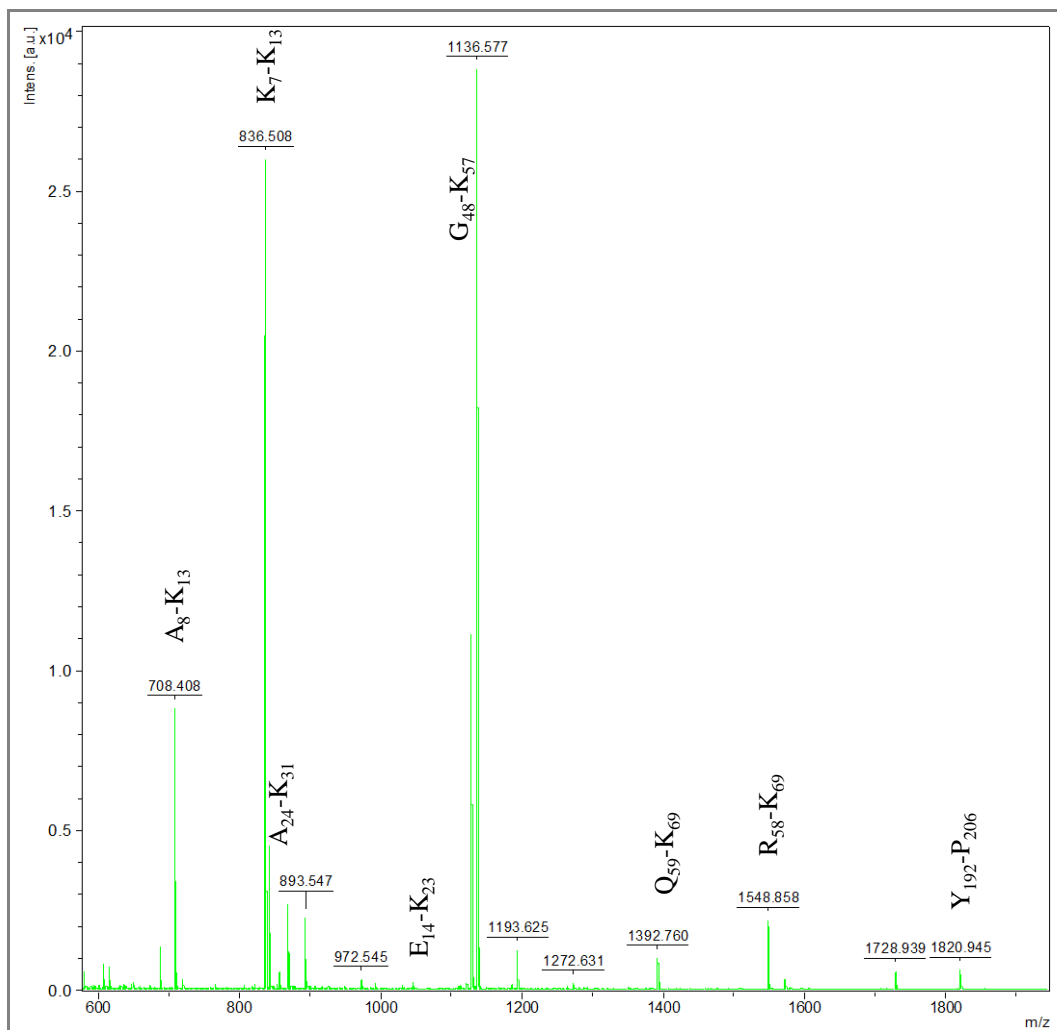
151 SLVGDIGNVN MWDFVLSPDE INTIYLGGPF SPNVLNWRAL KYEVQGEVFT

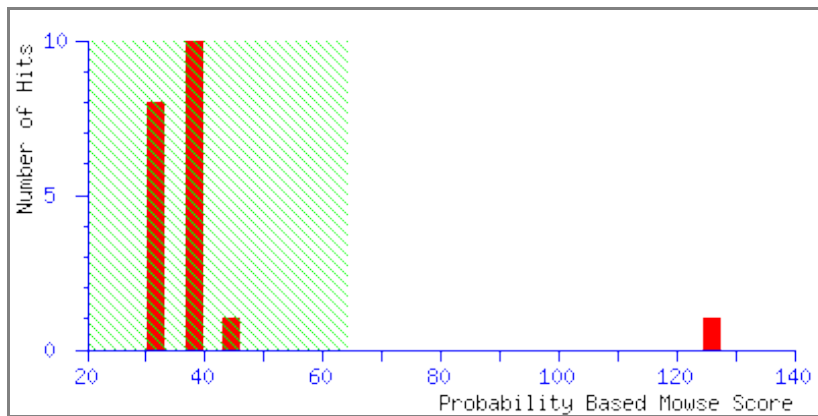
201 KPQLWP

Abbildung 24 Identifizierung von CRP im Ausgangsmaterial.

Das Protein wurde durch MALDI-TOF-MS Peptidmassen Fingerprint identifiziert (A). Es ergab sich dabei ein Mowse-Score von 149 (B) bei einer Sequenzabdeckung von 39 % (C).

A



B**C**

1 QTDM**SRKAFV FPKESDTSYV SLKAPLTKPL** KAFTVCLHFY TELS**STRGYS**

51 **IFS**YAT**KRQD NEILIFWSKD** IGYSFTVGGS EILFEVPEVT VAPVHICTSW

101 ESASGIVEFW VDGKPRVRKS LKKGYTVGAE ASIILGQEQD SFGGNFEGSQ

151 SLVGDIGNVN MWDFVLSPDE INTIYLGGPF SPNVLNWRAL **KYEVQGEVFT**

201 **KPQLWP**

Abbildung 25 Identifizierung von CRP im Eluat der Affinitätschromatographie.

Das Protein wurde durch MALDI-TOF-MS Peptidmassen Fingerprint identifiziert (A). Es ergab sich ein Mowse-Score von 126 (B) bei einer Sequenzabdeckung von 30 % (C).

3.2.2 Affinitätschromatographie mit TEPC-15

Die Säule wurde erneut getestet, wobei diesmal als Kontrolle der PC-spezifische Antikörper TEPC-15 verwendet wurde. In früheren Studien bei der Suche nach PC-substituierten Proteinen wurde TEPC-15 als primärer Antikörper zur Erkennung von PC-Epitopen eingesetzt [62]. Es handelte es sich um einen PC-spezifischen monoklonalen Antikörper (Maus Ig A). Die Gelelektrophorese wurde gemäß der Literatur des Herstellers (Sigma) unter reduzierenden Bedingungen durchgeführt. Für das Ausgangsmaterial wurden pro Geltasche jeweils 20 µg TEPC-15 in SDS-Probenpuffer (s. 2.8.3, Puffer B) aufgenommen und auf das 1D-SDS-Gel

aufgetragen. Das Eluat wurden nach der Affinitätschromatographie lyophilisiert, ebenfalls im SDS-Probenpuffer gelöst (s. 2.8.3) und auf das Gel aufgetragen. Das Gel wurde zur Darstellung der Banden mit Silber (s. 2.10.2) gefärbt. Es wurde exemplarisch eine Bande aus dem gefärbten Gel (s. Abb. 26, Markierung) ausgeschnitten und tryptisch verdaut (s. 2.11). Anschließend wurden die Banden mithilfe von MALDI-TOF-MS Peptide Mass Fingerprint und MASCOT Datenbanksuche analysiert(s. 2.12.1). Die Analyse führte zu einer Untereinheit des TEPC-15 mit einem Molekulargewicht von 14 kDa und einem isoelektrischen Punkt von 6,51 (s. Abb. 27). Zudem wurden die gemeinsamen Sequenzen (B) zwischen der identifizierten leichten Kette des TEPC-15 und der in der Datenbank vorhandenen Sequenz der schweren Kette von TEPC-15 (C) verglichen. Identifizierte Peptide, die sowohl in der leichten als auch in der schweren Kette von TEPC-15 vorkommen, sind in Abb. 27(B, C) gekennzeichnet.

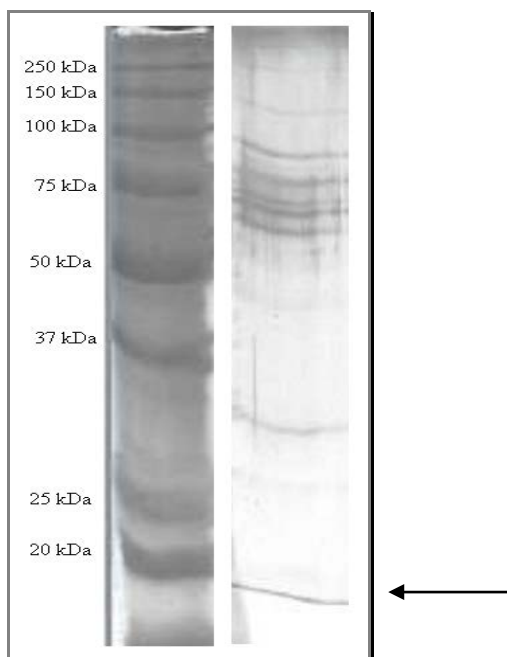
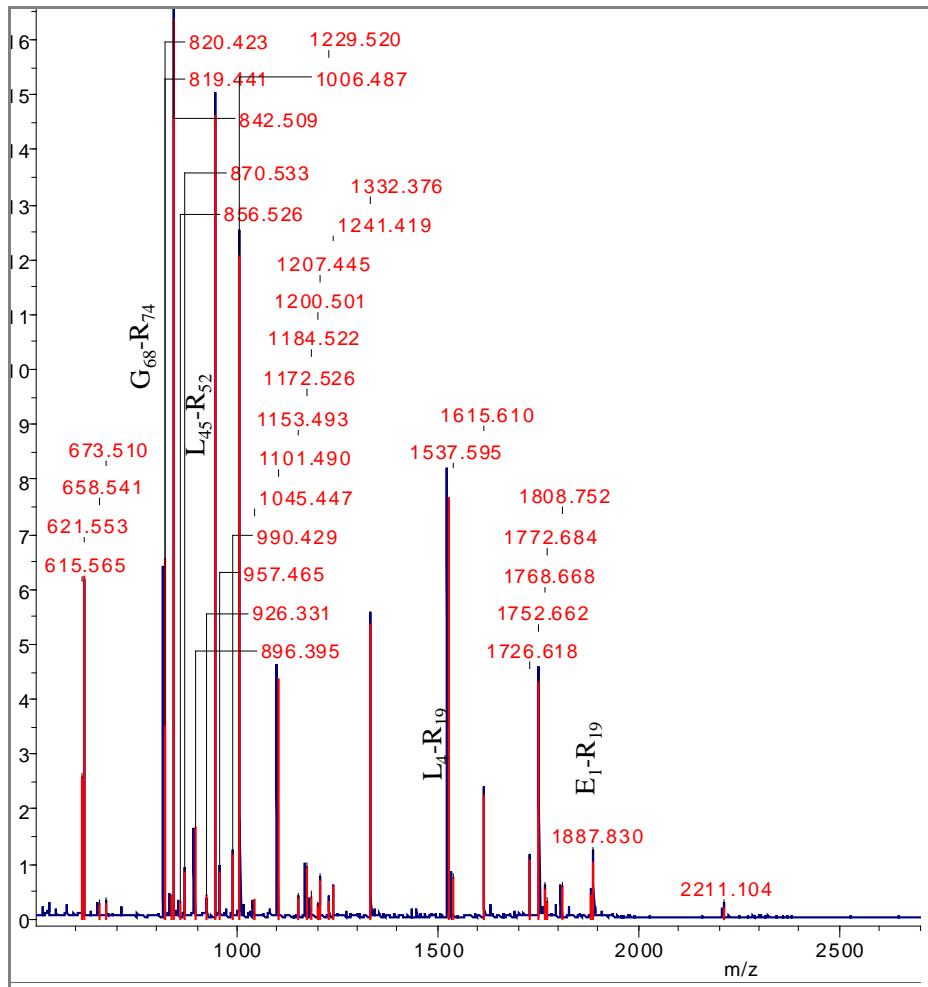


Abbildung 26 1D-Gel des Elutates der Affinitätschromatographie von TEPC-15 nach Silberfärbung; die markierte Bande wurde exemplarisch ausgeschnitten, tryptisch verdaut und über MALDI-TOF-MS analysiert.

A**B**

1 EVKLVESGGG LVQPGGSLRL SCATSGFTLS DFYMEWVRQT PGKRLEWIAA
 51 SRNKANDYTT EYSASVKGRF IVSRDTSQSI LYLQMNALRA EDTAIYYCAR
 101 DYGSSYWF DVWGAGTTVT VSS

C

1	834.494	-0.006 [68-74]	1	GRFIVSR
2	945.515	-0.053 [45-52]	0	LEWIAASR
3	1525.833	-0.127 [4-19]	0	LVESGGGLVQPGGSLR
4	1882.039	-0.179 [1-19]	1	EVKLVESGGGLVQPGGSLR

Abbildung 27 Identifizierung des Antikörpers TEPC-15 im Eluat der Affinitätschromatographie.

Das Protein wurde durch MALDI-TOF-MS Peptidmassen Fingerprint identifiziert (A). Es ergab sich ein Mowse-Score von 62 bei einer Sequenzabdeckung von 38 % (B); Identifizierte Peptide der leichten und der schweren Kette von TEPC-15(C).

3.2.3 Optimierung der Affinitätschromatographie mit *C. elegans*-Material

Nach Bindung der Probe an das Säulenmaterial erfolgte die Elution der Probe mit dem gleichen Puffersystem wie bei CRP bzw. TEPC-15. Danach erfolgte die Elution des gebundenen Materials durch die Hinzugabe des Elutionspuffers. Diese Elution wurde anfangs 15 min durchgeführt, da in der Literatur des Herstellers keine Zeitangabe vermerkt war [106]. Die Elutionszeit wurde später unter gleichen Versuchsbedingungen (s. 2.6) auf 30 min erhöht. Es konnte durch eine Proteinbestimmung gezeigt werden, dass durch eine längere Elutionszeit eine höhere Proteinausbeute erzielt wurde. Im Anschluss daran wurde die Elutionszeit auf 45 min erhöht, was jedoch zu keiner weiteren Steigerung führte. Bei einer Elutionszeit von 15 min ergab die Proteinbestimmung nach vier Durchgängen eine Proteinmenge von 367,29 µg (s. Abb. 28). Nach Verlängerung der Elutionszeit auf 30 min wurde bei der Proteinbestimmung nach ebenfalls vier Durchgängen eine Proteinmenge von 376,26 µg gemessen (s. Abb. 28).

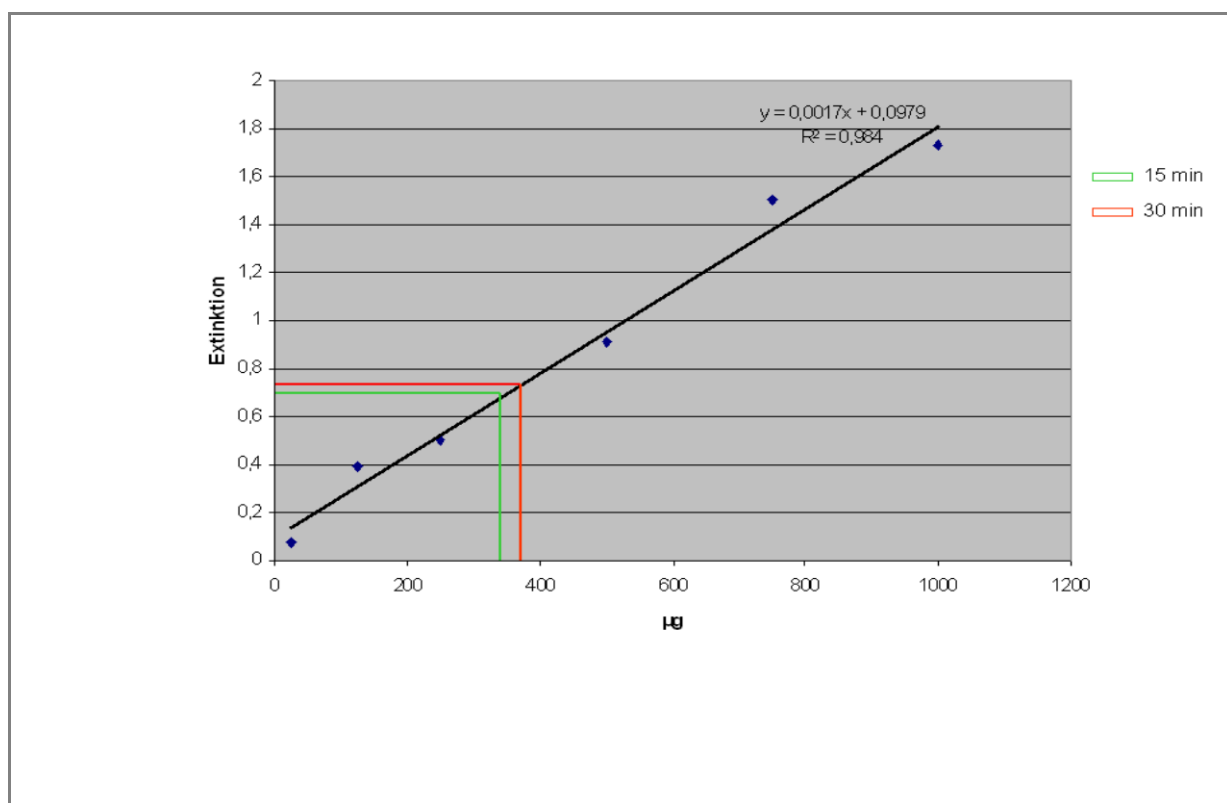


Abbildung 28 Proteinbestimmung nach Elutionszeiten von 15 min und 30 min

3.2.4 Isolierung von PC-bindenden Proteinen aus *C. elegans* durch Affinitätschromatographie

Die lyophilisierten *C. elegans* wurden in Tris- Lysispuffer extrahiert, zentrifugiert und mit Methanol-Chloroform gefällt (s. 2.7.3). Mit einem Teil des Extraktes wurde eine 2D-Gelelektrophorese durchgeführt.

Im Gegensatz dazu durchlief ein anderer Teil des *C. elegans*-Materials die Affinitätschromatographie (s. 2.6). Sowohl beim Gesamtextrakt als auch bei der Probe des Eluates der Affinitätschromatographie wurden 300 µg Proteine pro Strip für die 2D-Gelelektrophorese aufgetragen (s. 2.9). Die aufgetrennten Proteine wurden durch Silberfärbung sichtbar gemacht (s. 2.10.2). Im Vergleich der 2D-SDS-PAGE-Gele vom Gesamtextrakt bzw. vom Eluat der Affinitätschromatographie von *C. elegans* zeigten sich bezüglich der Quantität der Spots beim Gel des Eluates (s. Abb. 21) deutlich weniger Spots als beim Gel des Gesamtextraktes (s. Abb. 19). Während sich die Spots im Gesamtextrakt bezüglich des Molekulargewichtes und auch des isoelektrischen Punktes relativ ausgeglichen verteilt darstellten, waren die Spots im Gel des Eluates der Affinitätschromatographie vorwiegend größer als 30 kDa und fanden sich hauptsächlich im sauren Bereich des Gels wieder (s. Abb. 28).

3.3 Proteinidentifikation

3.3.1 Identifikation von PC-bindenden Proteinen aus *C. elegans* mittels MALDI-TOF-MS

Die Spots aus dem Eluat-Gel wurden im Folgenden mit dem Spot-Cutter aus dem Gel geschnitten und danach tryptisch verdaut (s. 2.11, Abb. 30). Anhand der resultierenden Peptide wurden mithilfe des MALDI-TOF-MS Peptide Mass Fingerprints und MASCOT Datenbanksuche die Proteine identifiziert. Es wurden insgesamt neun PC-bindende Proteine von *C. elegans* mittels MALDI-TOF-MS identifiziert. Die Proteine wurden auf dem Gel markiert (s. Abb. 30, 31) und tabellarisch aufgelistet (s. Tab.1). Die Funktion, die zelluläre Lokalisation sowie das Molekulargewicht und der isoelektrische Punkt der Proteine sind in Tab. 1 zusammengefasst. Bei 34 % der identifizierten Proteine ist die Funktion noch unbekannt, 33% sind am allgemeinen Stoffwechsel beteiligt, 11% sind Energiestoffwechsel, Reparaturmechanismen und der Signaltransduktion zuzuordnen (s. Abb. 29, Tab.1). Für drei

der identifizierten PC-bindenden Proteine wurde exemplarisch die entsprechende Identifikation durch Peptidmassen-Fingerprint, der Mowse-Score und die Sequenzabdeckung aufgeführt (s. Abb. 32-34).

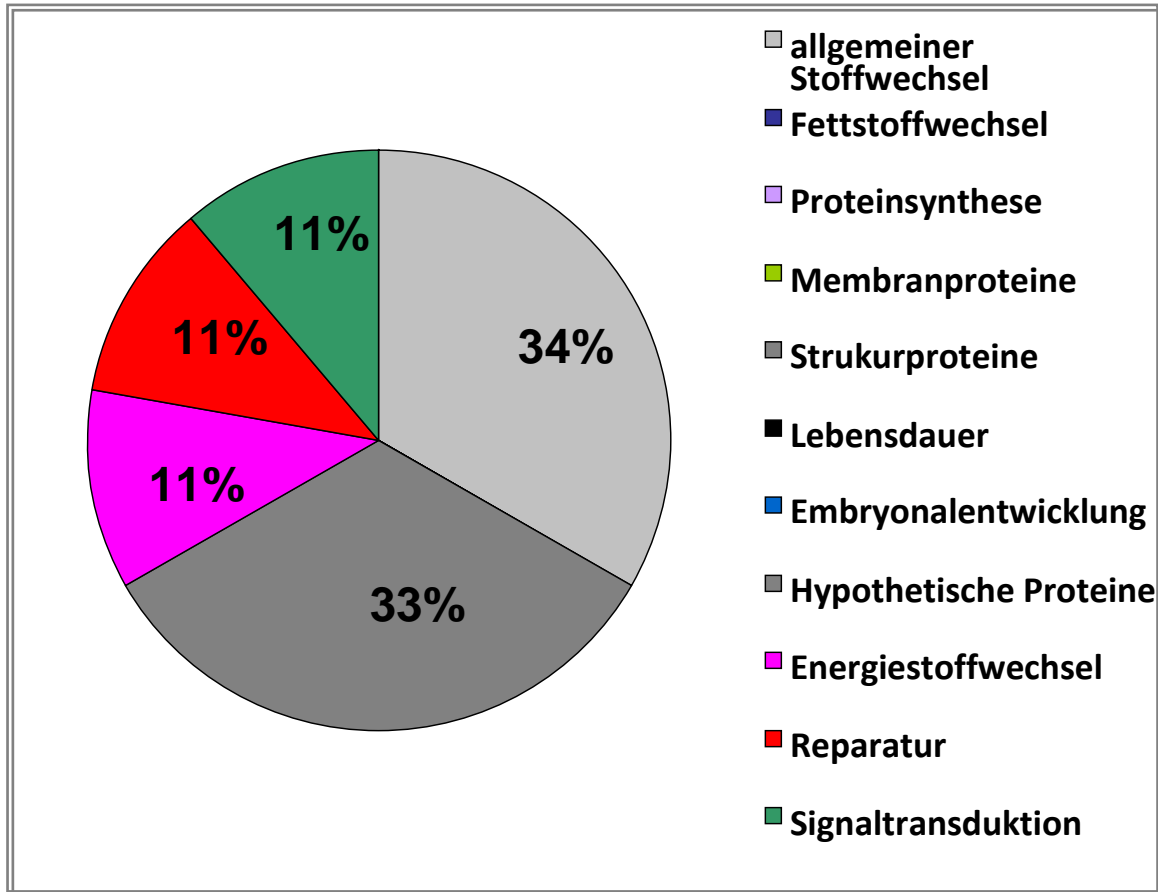


Abbildung 29 Durch MALDI-TOF-MS identifizierte PC-bindende Proteine von *C. elegans*

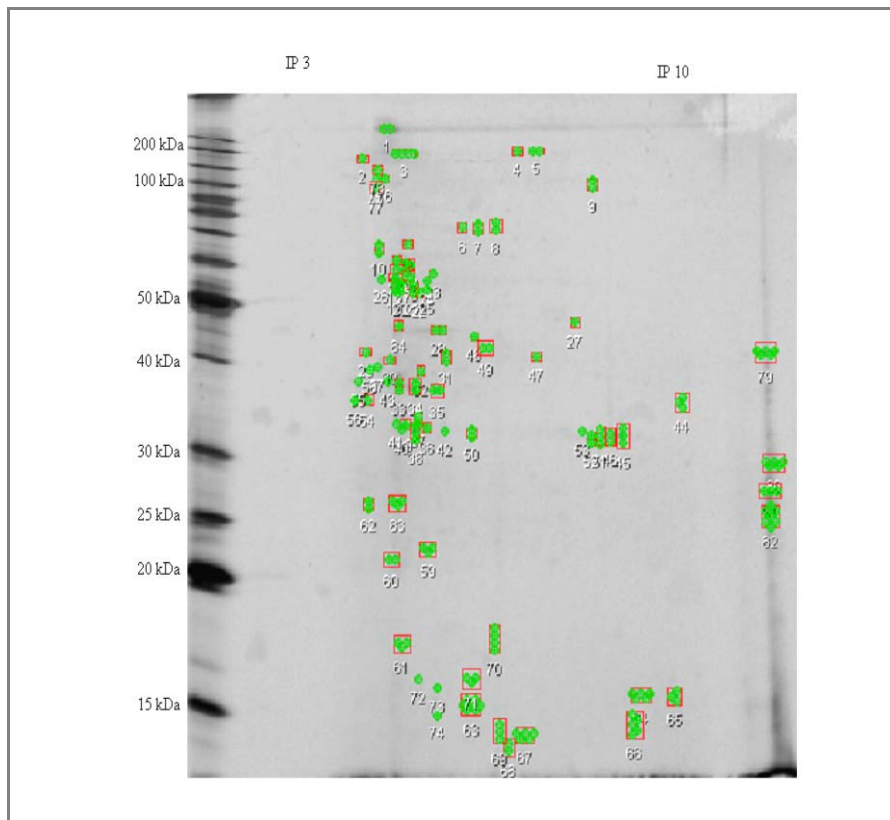


Abbildung 30 Analysierte Spots im Eluat-Gel von *C. elegans*

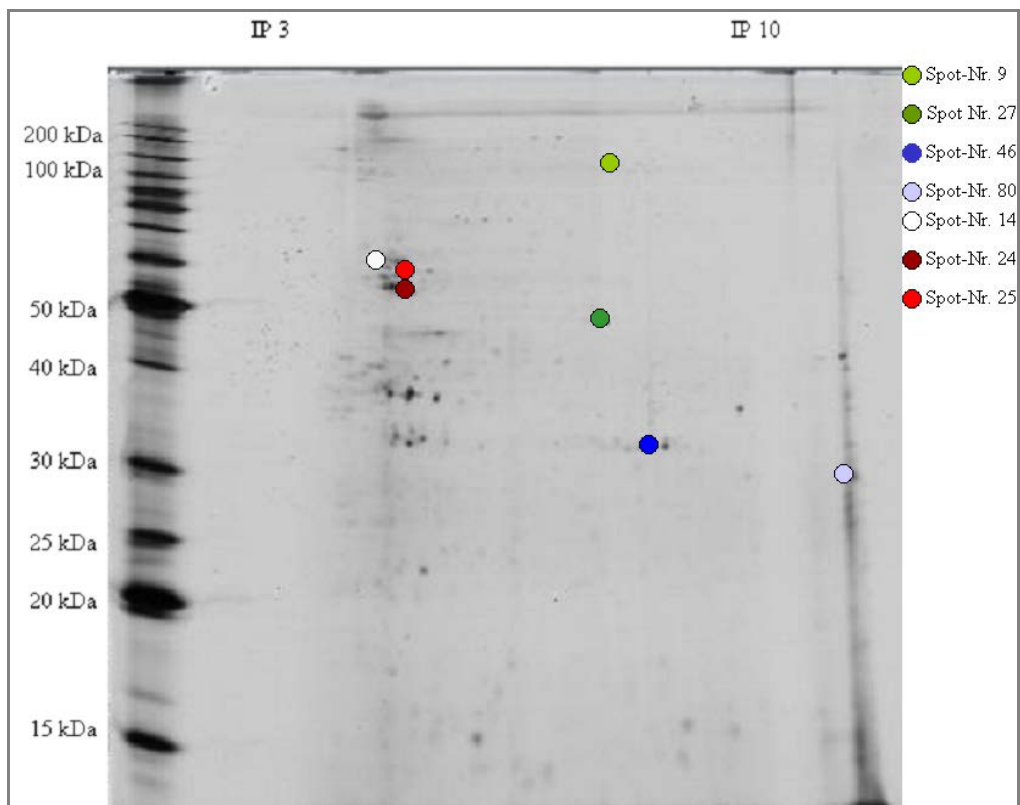
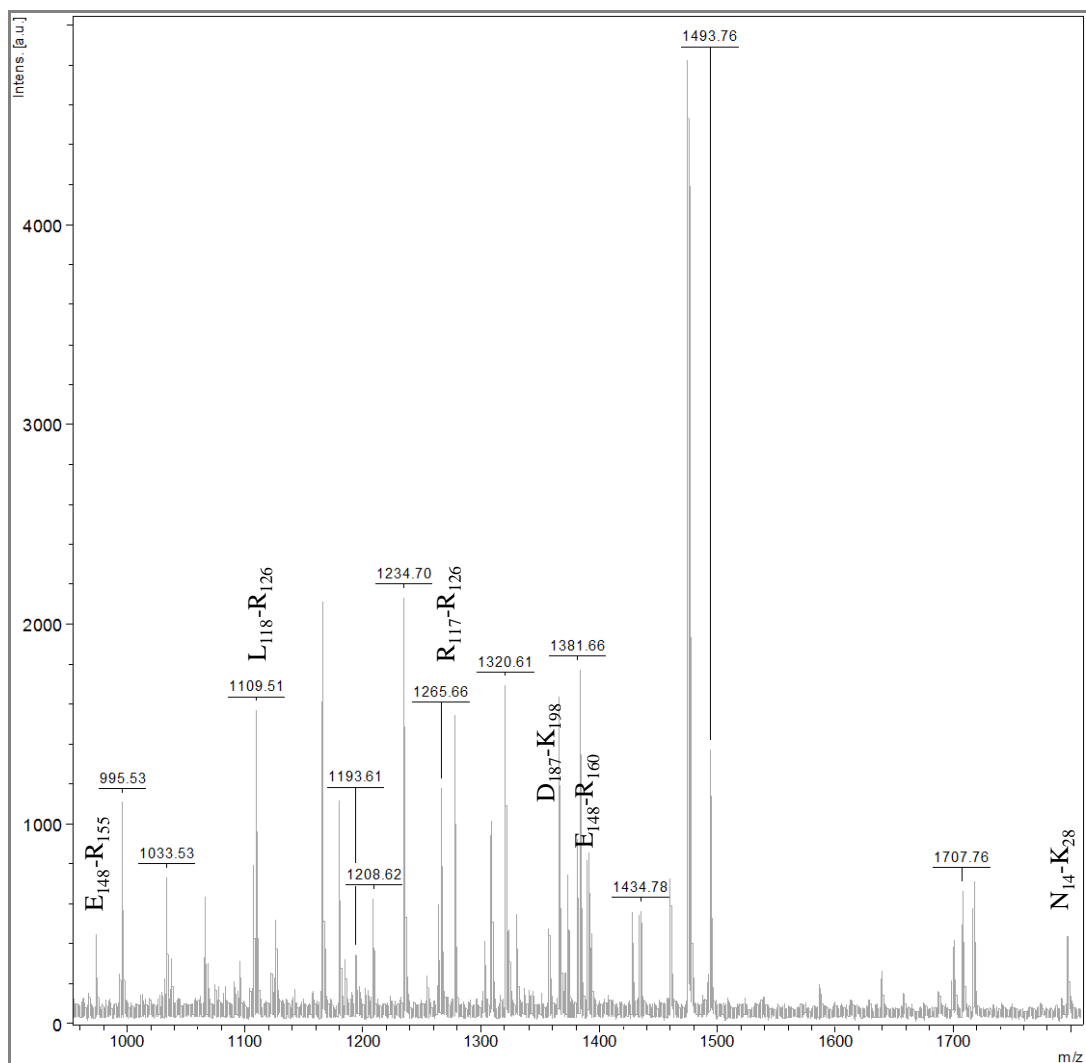


Abbildung 31 Identifizierte PC-bindende Proteinspots von *C. elegans*

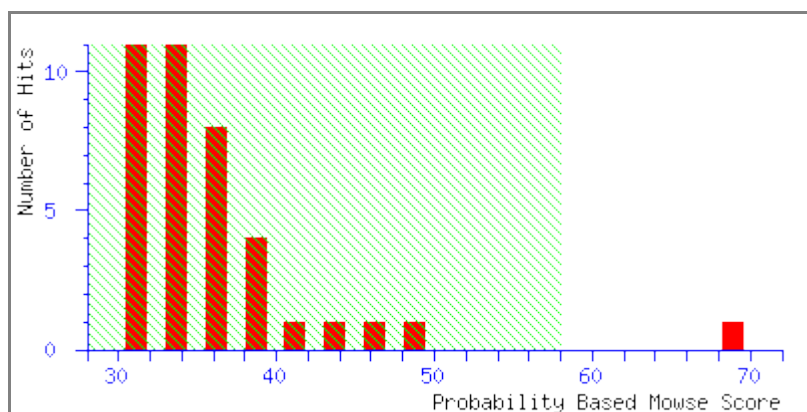
Spot-Nr.	Beschreibung	Funktion/ Lokalisation (wenn bekannt)	Masse in kD	pI theor.	Identifizierte Peptide	Score	Sequenzabdeckung
14	AH10.1, acs-10	Fettsäurestoffwechsel, Fettsäuresynthetase, Katalyse	63,50	8,30	6/ 33	61	11 %
24.1/ 2	R11A5.7	Zink-Carboxypeptidase	75,90	8,83	9/ 34	61	11 %
25	F29D11.2, capg-1	CAP-G-Untereinheit, Reparaturmechanismen der Zelle	132,35	8,10	12/ 28	70	12 %
27	C17H1.9	Unbekannte Funktion	41,22	6,89	8/ 27	59	20 %
46	W09H1.6b, lec-1	Galaktosebindung, extrazelluläre Matrix	32,66	6,36	5/ 15	62	14 %
	Beta-galaktosebindendes Protein GBP	Beta-Galaktose-Bindung	31,79	6,12	5/15	62	15 %
80	M03E7, memb-2	Unbekannte Funktion	25,68	9,20	8/18	134	39 %
	Hyp. Protein, R05G6.7	Kanalprotein für Ionen und hydrophile Moleküle, äußere Mitochondrien-Membran	33,11	9,20	8/18	131	36 %
9	F48A9.2	Unbekannte Funktion	25,67	9,95	6/37	69	21 %

Tabelle 1 **Durch MALDI-TOF-MS identifizierte PC-bindende Proteine von *C. elegans***

A



B

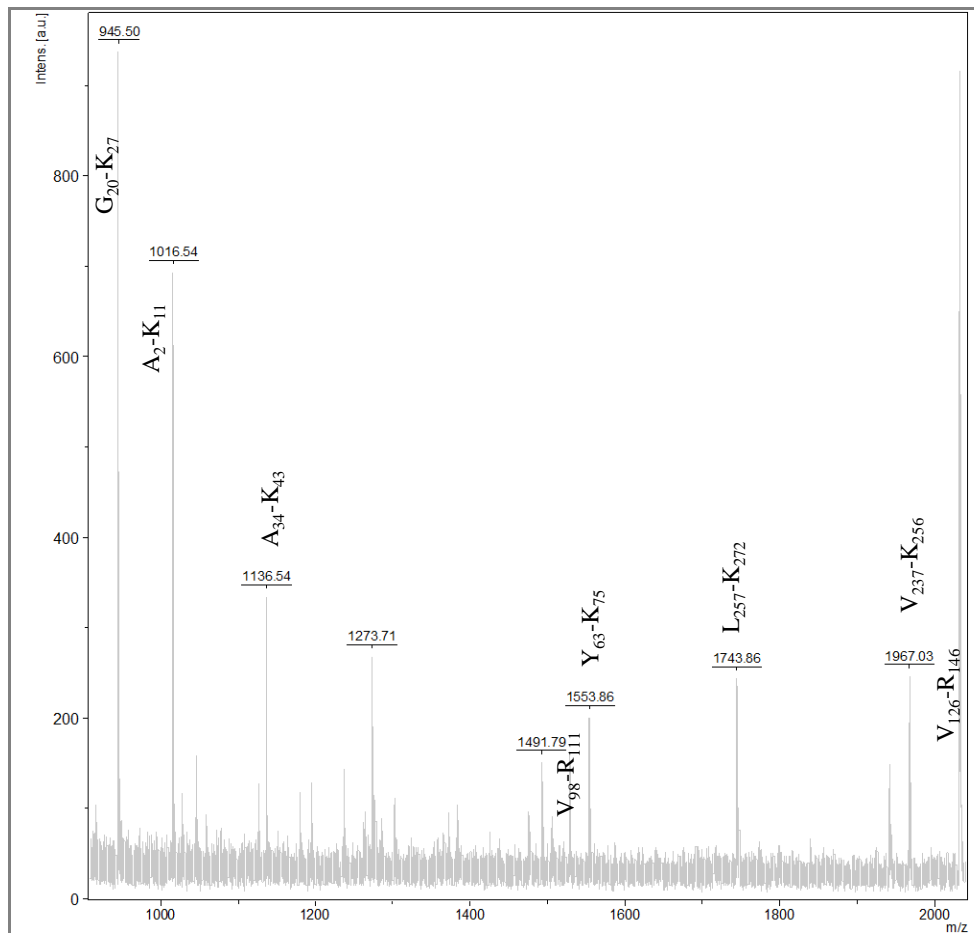


C

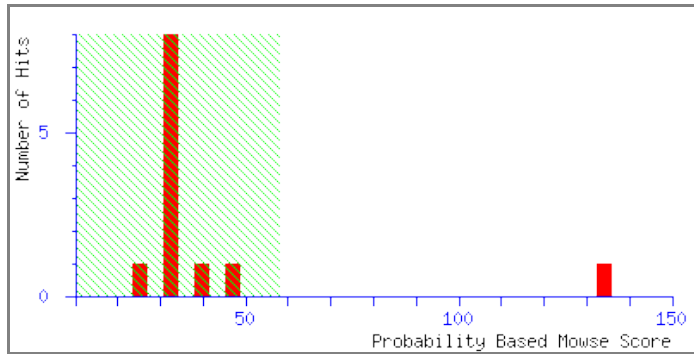
1 MEKDRKNSIE LDK**NLAENLF LTLNIF**KYF LKNPHSFFVS SPSMRGSHGY
 51 PPSRGNYDTY SSPSGGHGQM VINMKTTVT TSGGQHNGLVV HSAIQSASPS
 101 TSQSSWMSPY SESPSR**LED SLDMM**RSNTS LHRSSPLPIQ MVPSTS**RETL**
 151 **ISVGREGSSR** RENG YIGTPP KPPSPPPSPI YSFKGR**DSPP DEFIQPT**KL V
 201 LNVFRPQRKL PKSRNNFV PK NLNIEQYKST

Abbildung 32 Spektrum des Spots-Nr.9 und Identifizierung des PC-bindenden hypothetischen Proteins mit dem Gennamen F48A9.2 (A). Es ergab sich ein Mowse-Score von 69 (B) und eine Sequenzabdeckung von 21 % (C).

A



B

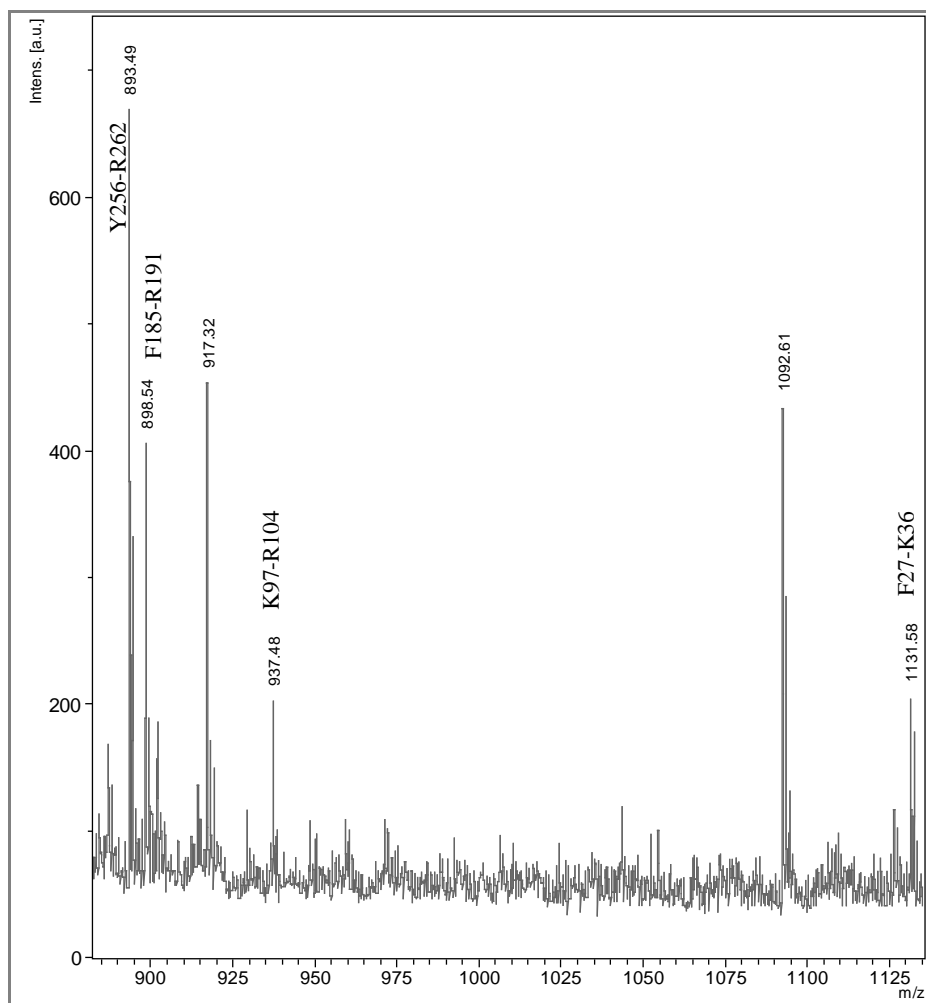


C

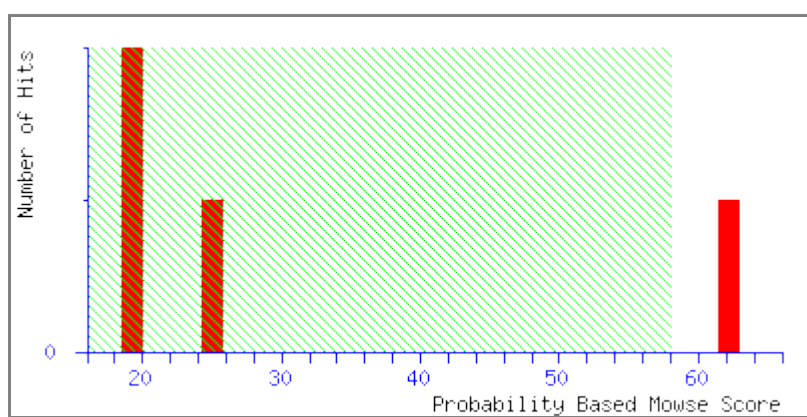
1 **M**APPTFADLG **K**SAKD~~L~~FN**K**G **Y**NFG**F**L**K**IDS TTRAGDNKEV **E**FKSAASHNI
 51 GSGKLGGNLD VK**Y**KIP**Q****Y**GI **T**L**T**E**K**WNTEN QLGTVIEVNE QFGRGLK**V****T**L
 101 **D**SLYAPHAG**K** **R**SGKV**K**LDWA LPTAR**V**TADV **G**VT**S**APVINA **A**GV**F**SRDGWL
 151 IGAAATFDSS SNKLAATSLA FGHSTPQYTL HSFVINSTDF GASLYHKVAS
 201 NVEVGTQLGW KVGNGADYA LATKYAPSRD LTVRAK**V****N**SS **S**Q**V**AVAATH**S**
 251 **L**SPALK**T**LS **T**Q**F**N**L**A**A**ND**A** **H**K**F**GLGLEFD PSN

Abbildung 33 Spektrum von Spot Nr.80 (A) und Identifizierung des PC-bindenden Proteins mit dem Gennamen M03E7. Es ergab sich ein Mowse-Score von 134 (B) und eine Sequenzabdeckung von 39 % (C).

A



B



C

1 MSSTPQFLRW YEQNKVPYR SVLQEK**FEPG QTLIVK**GSTI DESQRFTINL
 51 HSKTADFSGN DVPLHVSFRF DEGKIVLNSF SNGEWGKEER KSNPIK**KGDS**

101 **FDIR**IRAHDD RFQIIVDHKE FKDYEHRLPL SSISHLSDG DLYLNHVHWG
151 GKYYVPVYES GLANGLPVGK **SLLVFGTVEK** KAKR**FHVNLL** RKNGLDISFHF
201 NPRFDEKHVI RNSLAANEWG NEEREGKNPF EKGVGFDLVI QNEEYAFQVF
251 VNGER**YISFA** **HRADPHDIAG** LQISGDIELS GIQIQ

Abbildung 34 Spektrum des Spots-Nr. 46 (A) und Identifizierung des PC-bindenden hypothetischen Proteins mit dem Gennamen W09H1.6b. Es ergab sich ein Mowse-Score von 62 (B) und eine Sequenzabdeckung von 14 % (C).

3.3.2 Identifikation von PC-bindenden Proteinen aus *C. elegans* mittels ESI-MS

Von einem Teil der Eluate der Affinitätschromatographie wurde die eindimensionale Gelelektrophorese durchgeführt (s. 2.8). Die resultierenden Banden wurden mit Commassie gefärbt (s. 2.10.1) und im Folgenden tryptisch verdaut (s. 2.11). Nach Vorbereitung der Proben (s. 2.12.2) fand die ESI-MS-Messung durch die Arbeitsgruppe von Dr. Markus Krüger aus dem Max-Planck-Institut der Kerkhoff-Klinik in Bad Nauheim statt. Insgesamt konnten dabei 33 Proteine identifiziert werden (s. Tab. 2). Diese Proteine konnten durch die Analyse der Datenbanken bezüglich ihrer Funktion und Lokalisation in Gruppen eingeteilt werden:

25 % der identifizierten Proteine sind am Fettstoffwechsel beteiligt, weitere 25 % konnten dem allgemeinen Stoffwechsel zugeordnet werden, 15% der Proteine sind an der Proteinsynthese beteiligt, 15% sind Membranproteine oder haben direkten Kontakt zur Membran, 9% konnten als Strukturproteine und weitere 6 % als Regulatoren der Lebensdauer identifiziert werden, 3% übernehmen eine Aufgabe in der Embryonalentwicklung und 3 % haben eine bislang unbekannte Funktion (s. Abb.35, Tab.2).

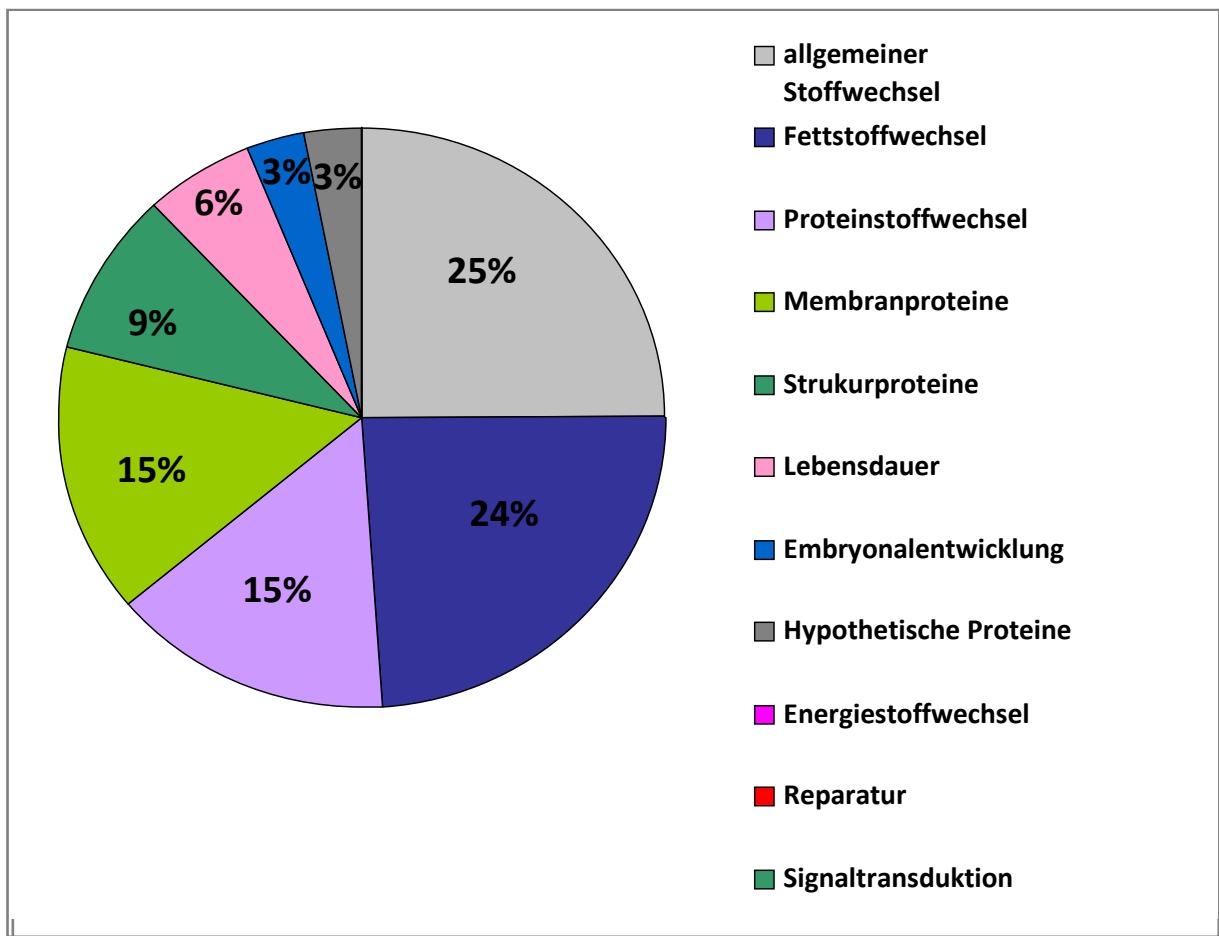


Abbildung 35 Durch ESI-MS identifizierte PC-bindende Proteine von *C. elegans*

Protein ID	Beschreibung	Funktion/Lokalisation (wenn bekannt)	Masse In kD	pI theor.	Sequenz-Abdeckung
1086863	Hypothetical protein T03G11.6	Methyltransferase	35,5	5,99	6,1
1109809	Hypothetical protein, R05F9.6	Phosphoglucomutase	64,7	6,45	1,8
1125763	Vitellogenin structural genes, Protein 5	Lipidtransport, Lipoprotein	186,4	7,0	2,5
113291	Actin protein 4, isoform a	Zellmotilität, Cytoplasma	41,8	5,15	17
114152908	Vitellogenin-6-precursor	Lipidtransport, Lipoprotein, Transmembranregion	193,2	7,23	2,9
1168193	14-3-3-like protein 1	Regulation der Lebensdauer	28,2	4,44	7,7
1729845	Tubulin-beta chain 2	Mikrotubuli, Cytoplasma	50,3	4,52	2,2

12113557	Vacuolar H-atpase protein 15	Säureproduktion, Verbindung zur Membran	54,2	6,25	4
146070256	Hypothetical protein, T22F3.3a	Phosphorylase, Familie der Glycogen-phosphorylasen, Muskelkontraktion	101	5,6	0,9
127743	Myosin-4, heavy chain	Myofibrille, Cytoplasma	224,7	5,47	2
17570193	Vit-1	Lipidtransport, extrazellulär	188	6,91	1,4
1350989	40S ribosomal protein S3	Ribonucleoprotein, RNA-Bindung	27,3	10,19	3,2
13592361	Ribosomal protein, large subunit protein 22	Ribonucleoprotein, alternatives Splicen	14,9	10,45	8,5
14573982	Importin beta family protein 3	Proteinbindung, Proteintransport	122	4,34	0,7
21913097	Saposin-like protein family protein 10, isoform b	Fettstoffwechsel	27,3	7,8	1,9
15988184	Calmodulin, CA2+Calmodulin dependent kinase, chain A	Calciumbindung	16,8	3,84	8,7
17508693	Ribosomal Protein, small subunit family member, rps-15	Ribonucleoprotein	17,2	11	7,9
3878073	Hypothetical protein H28016.1a	ATP—Synthase, innere Mitochondrienmembran	57,8	9,39	2
17534101	Hypothetical protein, F45D11.14	--	59,3	5,36	3,7
17541222	RACK 1 (mammalian Receptor of activated C Kinase	Guanin-bindendes Protein	35,8	6,93	2,2
17542008	Proteasome regulatory particle, non-ATPase like family member(rpn-1)	Proteasom-regulierendes Partikel	107,4	6,24	0,9

17551488	Saposin-like Protein family member (spp-13)	Fettstoffwechsel	14,4	8,21	12,8
17553788	Fatty Acid/ Retinol binding protein family member (far-1)	Fettsäure-und Retinolbindung, Lipidbindung, extrazellulär	20,1	7,85	11,5
17555492	Hypothetical protein W05G11.6a	GTP-Bindung, Gluconeogenese	73,2	6,43	3,7
17561770	Fatty Acid/Retinol binding protein family member (far-3)	Fettsäure-und Retinolbindung, Lipidbindung, extrazellulär	20,9	9,26	16,9
17563670	Ribosomal Protein, Small subunit family member (rps-16), Q22054.3	Ribonucleoprotein	16,3	10,92	22,2
17565854	Vacuolar H ATPase family member (vha-13)	Säureproduktion, Verbindung zu integralen Membranproteinen	66,46	4,81	3
17568359	Fourteen-Three-Three family member (ftt-2)	Regulation der Lebensdauer, Cytoplasma, Nucleus	28	4,52	5,2
17976515	ATP-Synthase subunit protein 2	ATP-Synthase, mitochondriale Membran	14,8	10,26	4,3
21281569	Saposin-like protein family protein 20	Fettstoffwechsel	24,5	4,88	5,5
51011309	Hypothetical protein F46H5.3a	Phosphotransferase, ATP-Bindung	44,16	6,5	7,6
3880276	Hypothetical protein T27E9.1a	Carrierprotein in der mitochondrialen Membran, Transmembran	33,04	10,31	3
34098414	Cytokinesis protein cey-1 precursor (Cell junction protein 1)	Zytokinese in der embryonalen Entwicklung	61,8	3,39	2,2

Tabelle 2 Zusammenfassung der durch ESI-MS identifizierten PC-bindenden Proteine von *C. elegans*

4 DISKUSSION

Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine Methode zur Isolierung PC-bindender Proteinen etabliert und optimiert. Dazu gehörten die Optimierung der *C. elegans*-Extraktion, der Fällung der Proteine sowie der Isolation der PC-bindenden Proteine von *C. elegans* durch die Affinitätschromatographie. Im zweiten Teil dieser Arbeit wurden die Proteine identifiziert und funktionell klassifiziert. Der grundsätzliche Versuchsablauf dieser Arbeit orientierte sich an der aktuellen Literatur zu vergleichbaren Fragestellungen an *C. elegans* und wurde durch eigene Ergebnisse entsprechend auf die Fragestellung dieser Arbeit abgestimmt.

Für eine Reproduzierbarkeit der Ergebnisse war die effiziente und reproduzierbare Proteinvorereitung notwendig. Durch die Aufnahme des Rohmaterials von *C. elegans* in den entsprechenden Lysispuffer (s. 2.4) sollten die zu untersuchenden Proteine optimal gelöst werden. Dies sollte die Identifizierung der PC-bindenden Proteine nach Affinitätschromatographie und Gelelektrophorese bei der Darstellung auf dem Gel sicherstellen [109]. Dabei wurden in dieser Arbeit die drei unterschiedlichen Puffer Tris, Lysispuffer mit CHAPS und ohne CHAPS miteinander verglichen (s. 2.4).

Das Lösen des *C. elegans*-Materials gestaltete sich im Tris-Puffer am Leichtesten und wurde durch die anschließend durchgeführte Proteinbestimmung mit der höchsten gemessenen Proteinmenge im Tris-Puffer bestätigt (s. 3.1.1). Dabei enthielt der Tris-Lysispuffer im Gegensatz zu den anderen beiden Lysispuffern keinen Harnstoff bzw. CHAPS, welche die Solubilisierung und zudem durch das Brechen der Wasserstoffbrückenbindungen (Harnstoff) bzw. das Lösen hydrophober Wechselwirkungen (CHAPS) die Denaturierung der Proteine förderten [110]. Die Protein-Protein-Wechselwirkungen sind im Tris-Puffer ohne denaturierende Reagentien ausreichend aufgehoben worden.

Durch die schonende Extraktion im Tris-Lysispuffer bleiben die Proteinstrukturen weitestgehend intakt und daher auch deren Bindungsfähigkeit an PC der Affi-Matrix erhalten, was zu einer höheren Ausbeute an Protein und dadurch zu einer höheren Spotzahl nach Visualisierung auf den Gelen führte (s. Abb. 16-18). Die Behandlung der Proteine im CHAPS- oder ohne-CHAPS-Lysispuffer hat durch die Denaturierung der Proteine eher zu einer Verminderung der Bindungsfähigkeit für das PC geführt, was die entsprechenden Ergebnisse erklären könnte (s. Abb. 16-18).

Die Fähigkeit der Säule zur Bindung PC-bindender Proteine konnte durch das akute-Phase-Protein CRP und den Antikörper TEPC-15 bestätigt werden.

In früheren Studien konnte bereits durch Gelfiltration und Dichtegradienten-Ultrazentrifugation das Molekulargewicht von CRP, wie es im Serum auftritt, auf 135 bis 140 kDa, bestimmt werden [111]. Unterschiede zwischen diesem und dem experimentell ermittelten Wert könnten durch eine Dissoziation des Proteins in kleinere Komponenten während der Aufreinigung oder durch die Bindung des CRPs im Serum an andere Lipide erklärt werden [112-113]. Bekannt ist, dass sich das Molekül aus 5-6 identischen, nicht glykosylierten Untereinheiten zusammensetzt, welche sich zu einem Ring zusammenlagern und nicht kovalent miteinander verbunden sind. Die einzelnen Untereinheiten bestehen aus einer Polypeptidkette mit 206 Aminosäuren und besitzen jeweils eine Masse von 24,3 kDa [114]. Darauf folgende Studien ermittelten durch weitere 2D-SDS-PAGEs ein Molekulargewicht von 23,3 kDa und untermauerten diesen Wert [115]. Die in dieser Arbeit gemessenen Werte des CRP-Eluats mit einem Molekulargewicht von 23,1 kDa stellen eine weitere Bestätigung dar. In früheren Studien zum CRP wurde SDS zur Herstellung denaturierender Bedingungen verwendet [105]. Auch in dieser Arbeit fand im denaturierenden Probenpuffer B durch die Anwesenheit des SDS sowohl am CRP-Ausgangsmaterial als auch im CRP-Eluat eine Denaturierung des CRPs statt, bei dem das Molekül teilweise in seine Untereinheiten zerfallen ist (s. Abb. 23).

Das TEPC-15 als Ig-A Antikörper dimerer Struktur eignete sich aufgrund seiner PC-bindenden Eigenschaft ebenso zur Kontrolle der Säule. Das IgA besitzt als Dimer ein Molekulargewicht von 320 kDa und setzt sich aus 2 schweren Ketten mit unterschiedlichen Molmassen ($IgA_1=56kDa$, $IgA_2=52kDa$) und 2 leichten Ketten zusammen, wobei beide Monomere durch eine J-Kette verbunden sind. Die in dieser Arbeit gemessene Untereinheit von 14 kDa (s. Abb. 25) zeigte bei einer Sequenzabdeckung von 38 % übereinstimmende Bereiche mit der leichten und der schweren Kette des TEPC-15 und bestätigte somit die PC-Bindung des Antikörpers an das PC der Säule.

Die Durchführung der Affinitätschromatographie (s. 2.6) orientierte sich an der Methodik der Literatur des Herstellers [106](s.2.6). Durch die Affinitätschromatographie konnte eine Bindung zwischen dem Ligand, dem an den Träger gebundenen PC, und dem Adsorbens, dem PC-bindenden Protein, aus dem *C. elegans*-Material erzielt werden [116]. Als Desorbens

zur Lösung und Eluierung der Proteine wurde in dieser Arbeit nicht der pH-Wert verändert, sondern mit PC bzw. EDTA gearbeitet. Aufgrund nicht vorhandener Zeitangaben in der Literatur wurden für ein optimales Elutionsergebnis Elutionszeiten von 15, 30, 45 min als realistisch betrachtet. Nach 30 min schienen die Proteine gemäß durchgeführter Proteinbestimmung (s. Abb. 28) vollständig eluiert worden zu sein.

Ob die Affinitätschromatographie ausschließlich PC-bindende Proteine gebunden hat oder aber eine Affinität der Proteine an Teile des Moleküls wie Cholin oder Phosphat für eine Bindung ausreichte, konnte nicht abschließend geklärt werden. Dies könnte durch ein Säulenmaterial, welches entweder nur Cholin oder Phosphat auf der Oberfläche trägt, überprüft werden. Ebenso könnte das Säulenmaterial anstelle von PC mit PE, P-MeE oder P-Me₂E bestückt werden, um zu untersuchen, ob die PC-bindenden Proteine dieser Arbeit eventuell auch Vorstufen des PCs z.B. aus dem PE-Methyltransferase-Weg (s. Abb. 8) erkennen und binden würden. Die Verwendung einer Elutionslösung, welche nicht wie in dieser Arbeit PC als kompetitiven Inhibitor enthält, sondern entweder nur Cholin oder Phosphat, könnte eine dritte Überprüfung der PC-Spezifität darstellen.

Frühere Studien ergaben, dass die Hauptkomponente der extrazellulären Matrix von *C. elegans* aus Kollagen bestand [117]. Dies machte die Aufarbeitung der Probe zur Minimierung bzw. Elimination störender Zellbestandteile und zur Abtrennung von Salzen und Lipiden unumgänglich. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass sich für die Darstellung der PC-bindenden Proteine nach Fällung mit Methanol-Chloroform im Vergleich zu Aceton quantitativ und qualitativ hochwertigere Resultate erzielen ließen. Dass eine verdünnte Probe nach einer Affinitätschromatographie ohne die Anwesenheit von Detergenzien, Lipiden, Salzen, Puffern und Beta-Mercaptoethanol in Bezug auf hydrophile und hydrophobe Gruppen erfolgreich gefällt werden kann, wurde bereits in früheren Studien aufgezeigt [118] und in dieser Arbeit durch die Methanol-Chloroform-Fällung untermauert.

Es ist durch frühere Studien bekannt, dass die Acetonfällung besonders bei verdünnten Proben nicht quantitativ ist. Hinzu kommt, dass stark hydrophobe Proteine bei der Aceton-Fällung nur unzureichend ausgefällt werden und es zur einer Anreicherung niedrigmolekularer Proteine kommt [119-120]. Im Vergleich beider Gele konnte dies bestätigt werden, da sich im Bereich hochmolekularer Proteine mit Molekulargewichten zwischen 75 kDa und 100 kDa eine leicht erhöhte Ausbeute in der Methanol-Chloroform-

gefällten Probe erzielen ließ. Eine Anreicherung von Proteinen mit niedrigen Molekulargewichten auf dem mit Aceton-gefällten Gel konnte jedoch nicht beobachtet werden (s. Abb. 19, 20).

Für einen aussagekräftigen Vergleich der 2D-SDS-PAGE-Gele war es notwendig, mögliche Fehlerquellen des Experiments zu kennen, die zu signifikanten Unterschieden in der Zusammensetzung der Eluate in der Affinitätschromatographie führten. Fehler bzw. Artefakte konnten in der unterschiedlichen Aufbereitung, Applikation, Auftrennung und schließlich bei der Auswertung der Proben entstehen. Da einige Fehler somit unvermeidbar waren, wurden die Ergebnisse einer 2D-Elektrophorese durch mehrfache Wiederholung abgesichert. Dabei konnte vor allem beobachtet werden, dass einige Proteine in Vergleichsgelen nicht gefunden werden konnten. Dies wiederum konnte auf die abweichenden Proteinmengen zwischen den Vergleichsgelen infolge unterschiedlicher Probenaufnahme der IPGs bei der Rehydratisierung (s. 2.9) oder unterschiedlich gutem Kontakt zwischen Probenplättchen und IEF-Strips (s. 2.9), Proteinverlusten während der IEF, Äquilibration und Durchführung der SDS-PAGE zurückgeführt werden [92].

Für eine gleichbleibende Qualität der Gele hatte eine zu geringe Polymerisationszeit einen nachteiligen Einfluss auf die Qualität der Gele. In der Gelmatrix kam es zu einer langsamen Nachpolymerisation [94], was die Herstellung der Gele einen Tag vor der Verwendung und eine Lagerung bei Raumtemperatur zum gleichmäßigen Auspolymerisieren notwendig machte.

Zur Optimierung der Gelelektrophorese wurden vergleichend sowohl IEF- als auch IPG-Strips verwendet. Dabei wurde bei den IEF-Strips die ursprünglichen Methode [121] mit Trägerampholyten verwendet, welche nach dem Anlegen von Spannung zur Kathode wanderten. Dieser sogenannte Kathoden-Drift und dazu das Plateau-Phänomen in der Mitte des Strips erschwerten jahrelang die Vergleichbarkeit zwischen 2D-SDS-PAGES verschiedener Laboratorien [122-123].

Im Gegensatz dazu ist der pH-Gradient bei den IPGs (engl. immobilized pH-Gradient) mit der homogenen Acrylamidmatrix copolymerisiert [124] und wird nicht erst, wie bei den IEF-Strips, durch die Trägerampholyten im elektrischen Feld aufgebaut. Dadurch bleibt im Gegensatz zur IEF der Gradient über die gesamte Trennzeit unverändert, eine Wanderung der Ampholine zur Kathode wird vermieden, eine erhöhte Reproduzierbarkeit und damit

eine höhere Vergleichbarkeit der resultierenden 2D-SDS-PAGEs geschaffen. In früheren Studien wurden die IEF-Strips aufgrund der höheren Ampholinkonzentration und der daraus resultierenden verbesserten Löslichkeit der Probe gerne verwendet [62]. Bei der pro Gel aufgetragenen Proteinmenge von 300 µg zeigten sich bei Benutzung der IPGs jedoch bessere Ergebnisse (s. Abb. 21, 22). Dies konnte durch eine bereits ausreichende Löslichkeit der Probe erklärt werden, die nicht durch die Zugabe von Ampholinen verbessert werden musste. In früheren Studien konnte bereits gezeigt werden, dass selbsthergestellte IEF und IPG-Strips den gekauften Strips qualitativ um nichts nachstanden [62].

Eine unzureichende Ampholinwanderung zur Kathode konnte die schlechten Ergebnisse bei den IEF-Strips nicht erklären, da im resultierenden 2D-SDS-PAGE-Gele vor allem im basischen Bereich des Gels Proteine nachgewiesen werden konnten (s. Abb. 22).

Generell konnte die Probe sowohl bei den IEFs als auch bei den IPGs auf zwei verschiedenen Wegen auf den Gelstreifen aufgetragen werden. In dieser Arbeit wurde bei den IEF-Strips das sogenannte *Cup-loading* angewandt. Dabei wurde der Strip vorher ohne Probe rehydratisiert (s. 2.9.1.2) und die Probe vor der IEF mithilfe eines Probenplättchens auf den Strip aufgetragen.

Bei den IPGs wurde die Sample-in-Gel-Rehydratisierung durchgeführt, bei der die Probe im Rehydratisierungspuffer gelöst und der Gelstreifen darin inkubiert wurde [92, 95, 125]. Bei der In-Gel-Rehydratisierung bestand der Vorteil darin, dass die Probe vollständig vom Gelstreifen aufgenommen wurde, solange die pro Strip aufnehmbare Probenmenge (s. 2.1.9.4) nicht überschritten wurde. Nachteilig erwies sich diese Methode in früheren Studien jedoch in Bezug auf den Transfer hochmolekularer Proteine. Hydrophobe Wechselwirkungen zwischen den Proteinen und der Fokussierungskammer und Größenausschlusseffekte der IPG-Gelmatrix stellen mögliche Erklärungen dar [126]. Da sich in dieser Arbeit im 2D-SDS-PAGE-Gele des Eluates der Affinitätschromatographie von *C. elegans* bei der In-Gel-Rehydratisierung auch hochmolekulare Proteine darstellen ließen (s. Abb. 21), hat dieser Effekt höchstens zu einer verminderten Anreicherung, nicht aber zu einem völligen Ausschluss hochmolekularer Proteine geführt. Ob sich die Anreicherung hochmolekularer Proteine durch die *Cup-loading*-Methode auf den IPG-Strips optimieren lässt und eventuell noch größere Proteine anzureichern sind, bleibt zu klären. Ein unzureichender Kontakt

zwischen Probenplättchen und Strip stellt eine mögliche Erklärung für die wenigen Spots beim Gel nach dem Cup-loading dar.

PC-bindende Proteine von *C. elegans* wurden zwar im gesamten pH-Bereich (s. Abb. 21) gefunden, wobei allerdings die meisten Spots im pH-Bereich zwischen pH 5-8 vorlagen. Möglich wäre zukünftig eine Aufspreizung dieses pH-Bereichs durch die Verwendung von kommerziell erhältlichen IPG-Strips mit einem schmaleren pH-Bereich. Die in früheren Studien genannten Vorteile der selbst hergestellten Strips bezüglich der Ampholinverwendung zur Aufspreizung gewünschter pH-Wertbereiche könnte für spätere Studien genutzt werden, waren für diese Fragestellung allerdings nicht notwendig.

Im Vergleich zwischen dem Ausgangs- und dem Eluatmaterial von *C. elegans* fiel das deutlich veränderte Spotmuster auf (s. Abb. 19, 21). Während im Ausgangsmaterial Proteine im pH-Bereich 3-10 und mit Molekulargewichten von 10-150 kDa nachweisbar waren, fand im Eluat vorwiegend eine Ankonzentrierung der Proteine im pH-Bereich 5-8 mit Molekulargewichten zwischen 30-70 kDa statt. Dass sich der theoretisch und der experimentell ermittelte Wert des pI der identifizierten Proteine (s. Abb. 30, Tab. 1) teilweise unterscheiden, kann von den posttranslationalen Modifikationen wie z.B. Phosphorylierungen herrühren. Ebenso konnte eine zu geringe Spannung während der IEF oder eine zu kurze Fokussierungszeit für eine unvollständige Fokussierung gesorgt haben, war aber wegen der Spotform eher auszuschließen.

Die beiden angewandten Verfahren zur Identifizierung der PC-bindenden Proteine, MALDI-TOF-MS und ESI-MS sind komplementär und ergänzen sich somit in ihren Ergebnissen. Die Unterschiede in der Identifikation sind darauf zurückzuführen, dass bei der MALDI-TOF-MS-Analyse mit 2D-Gelen gearbeitet wurde, während bei der ESI-MS-Methode 1D-Gele zur Analyse vorlagen. Eine zufriedenstellende Darstellung hydrophober Proteine gestaltet sich bei der 2D-Gelelektrophorese generell als schwierig. Gründe hierfür liegen z.B. in einer schlechten Löslichkeit der hydrophoben Proteine bei der Extaktion und der damit verbundenen Aggregation. Noch wahrscheinlicher scheint eine Präzipitation der Proteine an ihrem isoelektrischen Punkt während der IEF, die dazu führt, dass die präzipitieren und daher in der 2. Dimension nicht auf das 2D-SDS-Gel übertragen werden [127]. Ein weiterer Grund könnte sein, dass die hydrophoben, transmembranen Proteine niedrig abundant sind und daher von höher abundanten Proteinen überlagert werden [127-128]. Als weiterer

Punkt sind Schwierigkeiten bei der massenspektrometrischen Identifizierung zu nennen. Während des Verdau mit Trypsin werden die Proteine hinter den hydrophilen Aminosäuren Lysin und Arginin geschnitten. Da die hydrophoben, transmembranösen Proteine über weniger dieser hydrophilen Aminosäuren verfügen, bestehen weniger Spaltstellen für Trypsin. Dadurch sind die aus dem Verdau resultierenden Peptide für die massenspektrometrische Analyse zu groß und können nicht identifiziert werden [129-130]. Zudem ist bekannt, dass sich sehr kleine Proteine mit einem Molekulargewicht unter 25 kDa, sehr große Proteine mit einem Molekulargewicht von über 200 kDa und auch stark basische Proteine mit einem $pI > 10$ bei der 2-D-Gelelektrophorese unzureichend darstellen lassen.

Dagegen zeigte sich bei der näheren Betrachtung der mithilfe der 1-D-Gelelektrophorese und ESI-MS identifizierten Proteine, dass 6 der 33 Proteine einen pI von über 10 aufweisen, 8 Proteine ein Molekulargewicht von unter 25 kDa besitzen und 1 Protein mit einem Molekulargewicht von über 200 kDa als sehr groß einzustufen ist (s. Tab.2). Bei den neun identifizierten Proteinen der 2-D-Gelelektrophorese und MALDI-MS wurden dagegen weder Proteine mit einem Molekulargewicht über 10 noch sehr kleine oder sehr große Proteine identifiziert. Diese Befunde lassen vermuten, dass die vorhandenen Unterschiede nicht auf die unterschiedliche Messung über MALDI-MS oder ESI-MS zurückzuführen sind, sondern auf die 1-bzw. 2-D-Gelelektrophorese mit oben bereits erläuterten Unterschieden in Bezug auf das Ergebnis.

Bei den durch 2D-Gelelektrophorese und MALDI-MS identifizierten Proteinen konnten 34% der Proteine funktionell noch nicht annotiert werden. 33% wurden als Zink-Carboxypeptidasen bzw. Galaktosebindende Proteine dem allgemeinen Stoffwechsel zugeordnet. 11% nehmen eine Funktion als Membranproteine in der mitochondrialen Matrix ein, indem sie als Kanalproteine den Transport von hydrophilen Molekülen und Ionen in der äußeren Mitochondrienmembran steuern. Weitere 11% unterstützen die Reparaturmechanismen der Zelle.

Bei den über die 1D-Gelelektrophorese und ESI-MS ermittelten Proteinen können 24% der identifizierten PC-bindenden Proteine als Methyltransferasen, Phosphoglucomutasen, Phosphotransferasen, Phosphorylasen, Proteasom-regulierende Partikel und GTP-bindende Proteine dem allgemeinen Stoffwechsel zugeordnet werden. 25% der PC-bindenden Proteine nehmen als Lipoproteine eine Funktion in der Fettsäure-bzw. Retinolbindung oder

dem Fettstoffwechsel ein. An der Proteinsynthese sind 18% der Proteine als Ribonucleoproteine beteiligt. 15% der Proteine fungieren als Membranproteine und sind an der Säureproduktion, als ATP-Synthasen am Energiestoffwechsel und als Carrierproteine am Transport an der mitochondrialen Membran beteiligt. 6% der Proteine übernehmen als Proteine für die Zellmotilität und Myofibrille eine Aufgabe als Strukturprotein, weitere 6% dienen der Regulation der Lebensdauer. 3% der Proteine konnten der Zytokinese in der embryonalen Entwicklung zugeordnet werden, bei weiteren 3% ist die Funktion noch nicht geklärt.

Bei der näheren Betrachtung dieser über MALDI-MS und ESI-MS identifizierten PC-bindenden Proteine fällt auf, dass der Hauptteil der Proteine Aufgaben im allgemeinen Stoffwechsel, im Fettstoffwechsel bzw. in der Membran einnimmt.

Es ist zu vermuten, dass viele der identifizierten PC-bindenden Proteine wie z.B. Phosphoglucomutasen, Phosphorylasen usw. aufgrund ihrer Funktion nicht über eine PC-bindene, sondern nur über eine phosphatbindende Eigenschaft verfügen, welche ihnen im Stoffwechsel die Bindung an den Phosphatrest anderer Moleküle ermöglicht. Diese Proteine haben somit mit großer Wahrscheinlichkeit den Phosphatrest und nicht den Phosphorylcholinrest der Säulenmatrix gebunden.

Es konnte bereits eine große Anzahl PC-substituierter Proteine von *C. elegans* identifiziert werden. Von diesen identifizierten Proteinen waren der Hauptteil mitochondrial (36%) bzw. cytosolisch (27%) lokalisiert und die Proteine konnten bezüglich ihrer Funktion der Stoffwechselregulation (33%), der Signaltransduktion (17%), dem Proteinabbau (14%) bzw. der Struktur (11%) zugeordnet werden [62].

Diese Arbeit zeigte, dass drei der identifizierten PC-bindenden Proteine vermutlich sowohl über eine PC-Bindungsfähigkeit als auch über eine O-GlcNAc-Modifikation verfügen:

Das **lec- 1** ist ein Galaktose-bindendes Protein der extrazellulären Matrix (s. Tab. 1). Es ist aus 2 Domänen aufgebaut, welche beide homolog zu den 14 kDa-Galektinen von Vertebraten sind. Studien zu diesem Lec-1 konnten zeigen, dass in beiden Domänen eine Bindung an β -Galaktosidasen wie N-Acetyllactosamin ($\text{Gal}\beta 1\text{-4GlcNAc}$), Lacto-N-Neotetraose ($\text{Gal}\beta 1\text{-4GlcNAc}\beta 1\text{-3Gal}\beta 1\text{-4Glc}$) und Asialofetuin in *C. elegans* möglich ist. Dies setzt Aminosäurereste des lec-1 mit der Bindungsfähigkeit an Lactose oder N-Acetyllactosamin in *C. elegans* voraussetzt [131]. Das N-terminale Lectinende des lec-1 kann darüber hinaus eine

Bindung mit Sacchariden der Blutgruppe A eingehen, wobei das C-terminale Ende wenig Affinität zeigt [132]. Da das lec-1 sowohl über eine PC-Substitution als auch über eine PC-bindende Fähigkeit verfügt und zudem O-GlcNAcyliert ist, scheinen die Modifikationen des lec-1 mit PC bzw. O-GlcNAc und der PC-bindenden Domäne eine entscheidende Rolle zu spielen. An welchen Stellen dieser Domänen die Bindung zum PC und Zucker erfolgt und wo die Substitution des PCs stattfindet, ist noch nicht geklärt.

Vitellogenin 6 (vit-6) scheint neben der PC-bindenden Fähigkeit und der O-GlcNAcylierung ebenfalls über eine PC-Substitution zu verfügen. Weiterführende Studien mithilfe des monoklonalen Antikörpers TEPC-15 zeigten, dass PC-Bindung erst in der späten embryonalen Phase sowie in L2 proteingebunden vorkommt. Während der Embryogenese des Wurms konnte die PC-Modifikation mithilfe des Antikörpers TEPC-15 im Gastrula-Stadium zunächst diffus in der äußeren Zellschicht, im bean-stage in der dorsal gelegenen hypodermalen Precursorschicht und im sogenannten Kommastadium in der Hypodermis markiert werden [65, 82, 133]. Es kann vermutet werden, dass bei dieser Studie das vit-6 mithilfe des Antikörpers TEPC-15 gebunden wurde, da das vit-6 während des Eistadiums der Embryogenese als Transmembranprotein fungiert und vermutlich eine Funktion beim Lipidtransport einnimmt. Bekannt ist zudem, dass vit-6 über eine metallbindende Eigenschaft verfügt [134]. Es kann daher vermutet werden, dass vit-6 z.B. eine Art Schutzfunktion einnimmt, indem es andere Proteine vor Oxidation schützt.

Das Protein mit dem Gennamen **H28016.1** hat als Protein der inneren Mitochondrienmembran eine Funktion im Energiestoffwechsel als Untereinheit der ATP-ase. und verfügt ebenfalls neben der O-GlcNAc-Modifikation auch über eine PC-Substitution [62]. Es könnte somit über seine PC-Modifikation in der mitochondrialen Zellmembran verankert sein, während es über seine PC-bindende Domäne den Phosphatrest des ATP bindet, um dies anschließend zu aktivieren.

Auffällig ist, dass 15 % der über ESI-MS identifizierten PC-bindenden Proteine als Transmembranproteine fungieren. Diese Transmembranproteine sitzen auf der Oberfläche der Zelle oder innerhalb der mitochondrialen Membran. Sie können damit in direkten Kontakt zu anderen Zellen treten, die über PC-substituierte Proteine verfügen. Über diese Bindung sind Zell-Zell-Interaktionen und Zell-Zell-Kommunikationen zwischen den Zellen möglich.

Ausblick

Die Ergebnisse dieser Arbeit liefern einen ersten Überblick über mögliche Proteine von *C. elegans* mit PC-bindenden Eigenschaften. Die Verfahren der 1- und 2-dimensionalen Gelelektrophorese haben sich bei der Trennung optimal ergänzt. Als längerfristiges Ziel jedoch stellt sich die Optimierung der Identifizierung hydrophober Proteine mithilfe der 2-dimensionalen Gelelektrophorese dar.

Wie bereits erwähnt sollte überprüft werden, ob bei den identifizierten Proteinen tatsächlich eine Bindung an PC als gesamtes Molekül vorlag oder bereits eine Bindung an einen Teil des PCs wie z.B. an den Phosphat- bzw. Cholinrest der Säulenmatrix für die Anreicherung ausreichend war.

Alternativ könnte versucht werden, PC-bindende Proteine durch Photoaffinitätsmarkierung mit entsprechenden PC-Konjugaten zu markieren, selektiv zu isolieren und anschließend zu identifizieren.

Welche Bedeutung die PC-bindende Eigenschaft für die Entwicklung, die Fertilität und auch für die Steigerung der Pathogenität des Wurms hat, könnte in RNAi-Studien durch Unterbindung der Expression der identifizierten Proteine untersucht werden. Ein anderer möglicher Ansatz zur Ausschaltung der PC-bindenden Fähigkeit wäre die kompetitive Inhibierung der PC-bindenden Domäne mit PC-Mimetika, welche die Bindungsstelle blockieren.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Um effiziente Pharmaka gegen Nematodeninfektionen, wie z.B. der Flussblindheit, entwickeln zu können, ist die Erforschung der Pathogenitätsmechanismen bei diesen Infektionen sehr wichtig. Diese wiederum basiert u.a. auf den Methoden der Proteinanalytik. Die vorliegende Arbeit beinhaltet zunächst die Etablierung einer Extraktionsmethode und der Durchführung der Gelelektrophorese von *C. elegans*- Proteinen. Dabei wurde die Methodik speziell auf die Identifikation von PC-bindenden Proteinen von *C. elegans* ausgerichtet. Die Optimierung der Probenaufbereitung mit Lyse und Fällung zeigte sich als notwendig, um eine zufriedenstellende Qualität des resultierenden Spotmusters auf dem Gel zu erhalten. Bei der Lyse wurden drei unterschiedliche Lysispuffer (TRIS, CHAPS und ohne CHAPS) verglichen, wobei sich die Lyse mit Tris am Effektivsten gestaltete. Bezüglich der Fällung wurde die Aceton-Fällung mit der Methanol- Chloroform-Fällung verglichen. Hier zeigten sich bei der Fällung mit Methanol-Chloroform auf dem Gel weniger Salzspuren, eine höhere Quantität und Qualität der dargestellten Spots. Bei der Färbung der 2D-Gele zeigte die Silberfärbung bessere Ergebnisse als die Commassie-Färbung.

Bei der isoelektrischen Fokussierung im Rahmen der zweidimensionalen Gelelektrophorese zeigte sich im Vergleich zwischen IEF-und IPG-Strips eine höhere Sensitivität bei den IPG-Strips. Die Methode der In-Gel-Rehydratisierung wurde mit dem Cup-Loading verglichen und erwies sich als vorteilhaft.

Die Qualität der Säule wurde mithilfe des Akute-Phase-Proteins CRP und des Antikörpers TEPC-15 getestet. Die Affinitätschromatographie wurde bezüglich der Elutionszeit von 15 min auf 30 min erhöht, um eine ausreichende Elution des gewünschten Proteins zu erhalten. Nach Durchführung der 2-dimensionalen Gelelektrophorese waren auf dem Eluat-Gel von *C. elegans* im Vergleich zum Extrakt-Gel deutlich weniger Proteine erkennbar. Insgesamt wurden nach dem Verdau der Spots, der Messung durch MALDI-MS und der Datenbanksuche neun PC-bindende Proteine identifiziert. Die Analyse eines 1D-Gels derselben Probe mithilfe von ESI-MS ergab weitere 33 PC-bindende Proteine. Die Mehrzahl der Proteine scheint eine Rolle im Metabolismus, beim Lipid-Stoffwechsel und als Bestandteil der Biomembran zu spielen.

6 SUMMARY

For the development of efficient drugs against infections with filarial worms, which cause several diseases for example riverblindness, the understanding and investigation of the pathogenic mechanisms is necessary. The basis for this are e.g. proteome analyses.

The first part of this thesis focused on the optimization of methods for the extraction and gel electrophoresis of proteins from *C. elegans* with a special focus on PC-binding proteins. It turned out, that the optimal sample preparation including lysis and protein precipitation was essential for achieving a spot pattern of good quality in gel electrophoresis. Three different buffer systems (Tris, CHAPS and without CHAPS) for lysis were compared. The Tris-buffer turned out to be the most appropriate.

For protein precipitation, acetone and methanol-chloroform were comparatively examined. Here, methanol-chloroform resulted in less salt streaking and a higher number and quality of protein spots. Silver staining was found to be superior to Coomassie staining. For isoelectric-focusing in 2D-gel electrophoresis IPG-strips showed a higher sensitivity compared to IEF-strips. Additionally, in-gel rehydration was found to be superior compared to cup-loading.

The quality of the affinity column was tested with the acute phase protein CRP and the antibody TEPC-15. For affinity chromatography the elution time was extended from 15 to 30 min to achieve a sufficient elution of the bound proteins. After 2-dimensional gel electrophoresis a significantly lower number of proteins were detected in the eluate compared to the whole protein extract from *C. elegans*.

In total, after in-gel digest of the spots, MALDI-MS analyses and database searches nine PC-binding proteins were identified. The analysis of the respective sample by 1D gel electrophoresis and subsequent ESI-MS analysis resulted in the identification of 33 additional proteins.

The identified PC-binding proteins appear to have important functions in metabolism, lipid binding and as membrane constituents.

7 LITERATUR

1. HOUSTON, K.M. AND W. HARNETT, STRUCTURE AND SYNTHESIS OF NEMATODE PHOSPHORYLCHOLINE-CONTAINING GLYCOCONJUGATES. *PARASITOLOGY*, 2004. **129**(PT 6): P. 655-61.
2. BRENNER, S., *THE GENETICS OF CAENORHABDITIS ELEGANS*. *GENETICS*, 1974. **77**: P. 71-94.
3. BAUMEISTER, R. AND L. GE, *THE WORM IN US - CAENORHABDITIS ELEGANS AS A MODEL OF HUMAN DISEASE*. *TRENDS BIOTECHNOL*, 2002. **20**(4): P. 147-8.
4. LOCHNIT, G., R. BONGAARTS, AND R. GEYER, SEARCHING NEW TARGETS FOR ANTHELMINTHIC STRATEGIES: INTERFERENCE WITH GLYCOSPHINGOLIPID BIOSYNTHESIS AND PHOSPHORYLCHOLINE METABOLISM AFFECTS DEVELOPMENT OF CAENORHABDITIS ELEGANS. *INTERNATIONAL JOURNAL FOR PARASITOLOGY*, 2005. **35**(8): P. 911-923.
5. CHEN, N., ET AL., WORMBASE: A COMPREHENSIVE DATA RESOURCE FOR CAENORHABDITIS BIOLOGY AND GENOMICS. *NUCLEIC ACIDS RES*, 2005. **33 DATABASE ISSUE**: P. D383-9.
6. WWW.WORMATLAS.ORG.
7. RIDDEL, D.L., *THE DAUER LARVAE*. IN WOOD, W.B. *THE NEMATODE CAENORHABDITIS ELEGANS*, 1988: P. 393-412.
8. CHEN F., D.D., FERRARI, A., GÖTZ, J., POSTTRANSLATIONAL MODIFICATIONS OF TAU-ROLE IN HUMAN TAUPATHIES AND MODELING IN TRANSGENIC ANIMALS. *CURR DRUG TARGETS*, 2004. **5**: P. 503-515.
9. T, H., PROTEIN KINASES AND PHOSPHATASES: THE YIN AND YAN OF PROTEIN PHOSPHORYLATION AND SIGNALLING. *CELL*, 1995. **80**: P. 225-236.
10. SCHACHTER, H., THE JOYS OF HEXNAC. THE SYNTHESIS AND FUNCTION OF N- AND O-GLYCAN BRANCHES. *GLYCOCONJ J*, 2000. **17**(7-9): P. 465-83.
11. HELENIUS, A. AND M. AEBI, *INTRACELLULAR FUNCTIONS OF N-LINKED GLYCANS*. *SCIENCE*, 2001. **291**(5512): P. 2364-9.
12. ROYLE, T., ET ALL., AN ANALYTICAL AND STRUCTURAL DATABASE PROVIDES A STRATEGY FOR SEQUENCING O-GLYCANS FROM MICROGRAM QUANTITIES OF GLYCOPROTEINS. *ANAL BIOCHEM*, 2002. **340**(1): P. 70-90.
13. SCHACHTER, H., ET AL., FUNCTIONAL POST-TRANSLATIONAL PROTEOMICS APPROACH TO STUDY THE ROLE OF N-GLYCANS IN THE DEVELOPMENT OF CAENORHABDITIS ELEGANS. *BIOCHEM. SOC. SYMP.*, 2002. **69**: P. 1-21.
14. KAMEMURA, K.H., G.W., DYNAMIC INTERPLAY BETWEEN O-GLYCOSYLATION AND O-PHOSPHORYLATION OF NUCLEOCYTOPLASMIC PROTEINS: A NEW PARADIGM FOR METABOLIC CONTROL OF SIGNAL TRANSDUCTION AND TRANSCRIPTION. *PROG NUCLEIC ACID RES MOL BIOL*, 2003. **73**: P. 107-136.

15. HELENIUS, A. AND M. AEBI, *ROLES OF N-LINKED GLYCANS IN THE ENDOPLASMIC RETICULUM*. ANNU REV BIOCHEM, 2004. **73**: P. 1019-49.
16. SCHMITT, S., ET AL., STRUCTURE OF PRE-S2 N- AND O-LINKED GLYCANS IN SURFACE PROTEINS FROM DIFFERENT GENOTYPES OF HEPATITIS B VIRUS. J GEN VIROL, 2004. **85**(PT 7): P. 2045-53.
17. CIPOLLO, J.F., ET AL., N-GLYCANS OF CAENORHABDITIS ELEGANS ARE SPECIFIC TO DEVELOPMENTAL STAGES. J BIOL CHEM, 2005. **280**: P. 26063-26072.
18. HOUSTON, K., ET AL., INVESTIGATION OF THE NATURE OF POTENTIAL PHOSPHORYLCHOLINE DONORS FOR FILARIAL NEMATODE GLYCOCONJUGATES. MOL BIOCHEM PARASITOL, 2002. **123**(1): P. 55-66.
19. BRENDZA, K.M., ET AL., PHOSPHOETHANOLAMINE N-METHYLTRANSFERASE (PMT-1) CATALYSES THE FIRST REACTION OF A NEW PATHWAY FOR PHOSPHOCHOLINE BIOSYNTHESIS IN CAENORHABDITIS ELEGANS. BIOCHEM J, 2007. **404**(3): P. 439-48.
20. KASS I S, L.D.A., WANG C C, STRETTON A O, ASCARIS SUUM: DIFFERENTIAL EFFECTS OF AVERMECTIN B1A ON THE INTACT ANIMAL AND NEUROMUSCULAR STRIP PREPARATION. EXP.PARASITOL., 1982. **54**: P. 166-174.
21. NOROES J, A.D., CEDENHO A, PATHOGENESIS OF FILARIAL HYDROCELE: RISK ASSOCIATED WITH INTRASCROTAL NODULES CAUSED BY DEATH OF ADULT WUCHERERIA BANCROFTI. TRANS R SOC TROP MED HYG, 2003. **97**: P. 561-566.
22. WHO, MEETING OF THE INTERNATIONAL TASK FORCE FOR DISEASE ERADICATION. WKLY EPIDEM REC, 2007. **82**: P. 197-208.
23. BASANEZ MG, P.S., CHURCHER TS, , *RIVER BLINDNESS: A SUCCESS STORY UNDER THREAT*. PLOS MED, 2006. **3**: P. 371.
24. ASSEMBLY, F.W.H., *ELIMINATION OF LYMPHATIC FILARIASIS AS A PUBLIC HEALTH PROBLEM*. GENEVA, SWITZERLAND: WORLD HEALTH ASSEMBLY, 1997: P. 1-2.
25. [HTTP://APPS.WHO.INT/INF-FS/IMAGES/GRAPH_214_3.GIF](http://apps.who.int/inf-fs/images/graph_214_3.gif).
26. BRADLEY JE, W.J., BASÁÑEZ M-G, *ONCHOCERCIASIS*. PARASITOLOGY, 2005 . **10**: P. 781-801.
27. MURDOCH I, F.A., *FOTO*. J COMM EYE HEALTH, 2001. **14**(38): P. 20.
28. .KARAS M, B.D., BAHR U, HILLENKAMP F, , INT. J. MASS. SPECTROM.ION. PROC., 1987. **78**: P. 53-68.
29. W., O.H., *FILARIOSEN*. THIEME-VERLAG STUTTGART, 1977: P. 13, 340-342.
30. LEVENTHAL R, C.R.F., *MEDICAL PARASITOLOGY*. F.A.DAVIS COMPANY, 2002.
31. CHIODINI P, M.A.H., MANSEER D W, *ATLAS OF MEDICAL HELMINTHOLOGY AND PROTOZOOLOGY*. 2000. **4. AUFLAGE, CHURCHILL LIVINGSTONE**.
32. . WHO, GLOBALE PROGRAMME TO ELIMINATE LYMPHATIC FILARIASIS. PROGRESS REPORT ON MASS DRUG ADMINISTRATIONS IN 2006. WKLY EPIDEM REC 2007. **82**: P. 361-380.

- 33.OUAGADOUGOU, W.R.O., *ONCHOCERCIASIS CONTROL IN AFRICA*. GENEVA, SWITZERLAND: WORD HEALTH ORGANISATION, 2006: P. 1-4.
- 34.WHO, REPORT FROM THE 16TH INTERAMERICAN CONFERENCE ON ONCHOCERCIASIS, ANTIGUA, GUATEMALA. WKLY EPIDEM REC, 2007. **82**: P. 309-316.
- 35.CENTER, T.C., SUMMERY OF THE TENTH MEETING OF THE INTERNATIONAL TASK FORCE FOR DISEASE ERADICATION, ATLANTA. ATLANTA: THE CARTER CENTER, 2007: P. 1-4.
- 36.EA, O., THE GLOBAL PROGRAMME TO ELIMINATE LYMPHATIC FILARIASIS. TROP MED INT HLTH, 2000. **5**: P. 591-594.
- 37.RICHARDS FO, B.B., SAUERBREY M, SEKETELI A, *CONTROL OF ONCHOCERCIASIS TODAY: STATUS AND CHALLENGES*. TRENDS PARASITOL, 2001. **17**: P. 558-563.
- 38.KAMINSKY, R., *DRUG RESISTANCE IN NEMATODES: A PAPER TIGER OR A REAL PROBLEM?* CURR OPIN INFECT DIS, 2003. **16**(6): P. 559-64.
- 39.DENT J A, S.M.M., VASSILATIS D K, AVERY L, *THE GENETICS OF IVERMECTIN RESTISTANCE IN CAENORHABDITIS ELEGANS*. PROC NATL ACAD SCI U S A, 2000. **97**: P. 2674-2679.
- 40.AWADZI K, B.D., EDWARDS G, AN INVESTIGATION OF PERSISTENT MICROFILARIDERMIA DESPITE MULTIPLE TREATMENTS WITH IVERMECTIN, IN TWO ONCHOCERCIASISENDEMIC FOCI IN GHANA. ANN TROP MED PARASITOL, 2004. **98**: P. 231-249.
- 41.G, G.T., *IVERMECTIN 20 YEARS ON: MATURATION OF A WONDER DRUG*. TRENDS PARASITOL, 2005. **21**: P. 530-532.
- 42..KRAUSE R M, B.B., BERTRAND S, CORRINGER P J, GALZI J L, CHANGEUX J P, BERTRAND D, *IVERMECTIN: A POSITIVE ALLOSTERIC EFFECTOR OF THE ALPHA7 NEURONAL NICOTINIC ACETYLCHOLINE RECEPTOR*. MOL. PHARMACOL., 1998. **53**: P. 283-294.
- 43.BOKISCH A J, W.R.J., THE ACTION OF AVERMECTIN (MK 936) ON IDENTIFIED CENTRAL NEURONES FROM HELIX AND ITS INTERACTIONS WITH ACETYLCHOLINE AND GAMMA-AMINOBUTYRIC ACID (GABA)RESPONSES. COMP BIOCHEM PHYSIOL.C, COMP.PHARMACOL., 1986. **84**: P. 119-125.
- 44.B, R., ACTIONS OF ANAESTHETICS AND AVERMECTIN ON GABAA CHLORID CHANNELS IN MAMMALIAN DORSAL ROOT GANGLION NEURONES. BR J PHARMACOL, 1989. **98**: P. 167-176.
- 45..HOLDEN-DYE L, W.R.J., AVERMECTIN AND AVERMECTIN DERIVATIVES ARE ANTAGONISTS AT THE 4-AMINOBUTYRIC ACID (GABA)RECEPTOR ON THE SOMATIC MUSCLE CELLS OF ASCARIS; IS THIS THE SITE OF ANTIHELMETIC ACTION? PARASITOLOGY, 1990. **101**: P. 265-271.
- 46.ZHENG Y, H.B., YUAN J, WANG A P, HUNT D C, LUDMERER S W, SCHMATZ D M, CULLY D F, *IDENTIFICATION OF TWO NOVEL DROSOPHILA MELANOGASTER HISTAMINE-GATED CHLORIDE CHANNEL SUBUNITS EXPRESSED IN THE EYE*. J.BIOL.CHEM., 2002. **277**: P. 2000-2005.
- 47.SHAN Q, H.J.L., LYNCH J W, IVERMECTIN, AN UNCONVENTIONAL AGONIST OF THE GLYCINE RECEPTOR CHLORIDE CHANNEL. J. BIOL. CHEM., 2001. **276**: P. 12556-12564.

- 48.KHAKH, B.S., PROCTOR W R, DUNWIDDIE T V, LABARCA C, LESTER H A, *ALLOSTERIC CONTROL OF GATING AND KINETICS AT P2X(4)RECEPTOR CHANNELS*. J. NEUROSCI., 1999. **19**: P. 7289-7299.
- 49.KASS I S, W.C.C., WALROND J P, STRETTON A O, AVERMECTIN B1A, A PARALYZING ANTIHELMETIC THAT AFFECTS INTERNEURONS AND INHIBITORY MOTORNEURONS IN ASCARIS. . PROC NATL ACAD SCI U S A, 1980. **77**: P. 6211-6215.
- 50.BROWNLEE D J, H.-D.L., WALKER R J, ACTION OF THE ANTIHELMETIC IVERMECTIN ON THE PHARYGEAL MUSCLE OF THE PARASITIC NEMATODE, ASCARIS SUUM. PARASITOLOGY, 1997. **115**: P. 553-561.
- 51.HÖRAUF, A., FILARIASIS: NEW DRUGS AND NEW OPPORTUNITIES FOR LYMPHATIC FILARIASIS AND ONCHOCERCIASIS. CURRENT OPINION IN INFECTIOUS DISEASES, 2008. **21**: P. 673-681.
- 52.GILBERT J, N.C., MAKEPEACE BL, NJONGMETA LM, HASTINGS IM, ANTIBIOTIC CHEMOTHERAPY OF ONCHOCERCIASIS: IN A BOVINE MODEL, KILLING OF ADULT PARASITES REQUIRES A SUSTAINED DEPLETION OF ENDOSYMBIOTIC BACTERIA (WOLBACHIA SPECIES). J INFECT DIS, 2005. **192**: P. 1483–1493.
- 53.WWW.WHO.INT/TDR.
- 54.WWW.WHO.INT/TDROLD/TOPICS/IR/MOXIDECTIN.PDT.
- 55.HOERAUF A, B.D., ADJEI O, PEARLMAN E *ONCHOCERCIASIS*. BMJ, 2003. **326**: P. 207–210.
- 56.TAYLOR MJ, M.W., MCGARRY HF, MACROFILARICIDAL ACTIVITY FOLLOWING DOXYCYCLINE TREATMENT OF WUCHERERIA BANCROFTI: A DOUBLE-BLIND RANDOMISED CONTROLLED TRIAL. LANCET, 2005. **365**: P. 2216-2121.
- 57.HOERAUF, A., ET AL., ENDOSYMBIOTIC BACTERIA IN WORMS AS TARGETS FOR A NOVEL CHEMOTHERAPY IN FILARIASIS. LANCET, 2000. **355**(9211): P. 1242-3.
- 58.HÖRAUF, A., ET AL., ENDOSYMBIOTIC BACTERIA IN WORMS AS TARGETS FOR A NOVEL CHEMOTHERAPY IN FILARIASIS. LANCET, 2000. **355**(9211): P. 1242-3.
- 59.HASLAM, S.M., ET AL., CHARACTERISATION OF THE PHOSPHORYLCHOLINE-CONTAINING N-LINKED OLIGOSACCHARIDES IN THE EXCRETORY-SECRETORY 62 KDA GLYCOPROTEIN OF ACANTHOCEILONEMA VITEAE. MOL. BIOCHEM. PARASITOL., 1997. **85**: P. 53-66.
- 60.LOCHNIT, G., R.D. DENNIS, AND R. GEYER, PHOSPHORYLCHOLINE SUBSTITUENTS IN NEMATODES: STRUCTURES, OCCURRENCE AND BIOLOGICAL IMPLICATIONS. BIOL CHEM, 2000. **381**(9-10): P. 839-47.
- 61.LOCHNIT, G., ET AL., FIRST IDENTIFICATION OF A PHOSPHORYLCHOLINE-SUBSTITUTED PROTEIN FROM CAENORHABDITIS ELEGANS: ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF THE ASPARTYL PROTEASE ASP-6. BIOL CHEM, 2006. **387**(10-11): P. 1487-93.
- 62.GRABITZKI, J., ET AL., IDENTIFICATION OF PHOSPHORYLCHOLINE SUBSTITUTED PEPTIDES BY THEIR CHARACTERISTIC MASS SPECTROMETRIC FRAGMENTATION. EUROPEAN JOURNAL OF MASS SPECTROMETRY, 2005. **11**(3): P. 335-344.

63. GRABITZKI, J., ET AL., *THE PCOME OF CAENORHABDITIS ELEGANS*. EINGEREICHT BEI MOLECULAR AND BIOCHEMICAL PARASITOLOGY, 2007.
64. MACDONALD, M., D.B. COPEMAN, AND W. HARNETT, DO EXCRETORY-SECRETORY PRODUCTS OF ONCHOCERCA GIBSONI CONTAIN PHOSPHORYLCHOLINE ATTACHED TO O-TYPE GLYCANS? INT. J. PARASITOL., 1996. **26**: P. 1075-1080.
65. GERDT, S., ET AL., ISOLATION AND STRUCTURAL ANALYSIS OF THREE NEUTRAL GLYCOSPHINGOLIPIDS FROM A MIXED POPULATION OF CAENORHABDITIS ELEGANS (NEMATODA: RHABDITIDA). GLYCOBIOLOGY, 1997. **7**: P. 265-275.
66. DENNIS, R.D., G. LOCHNIT, AND R. GEYER, *STRATEGIES FOR PRELIMINARY CHARACTERIZATION OF NOVEL AMPHOTERIC GLYCOSPHINGOLIPIDS*. METHODS MOL. BIOL., 1998. **76**: P. 197-212.
67. WUHRER M, R.S., DENNIS R D, LOCHNIT G, SOBOSLAY P T, BAUMEISTER S, GEYER R, PHOSPHOCHOLINE-CONTAINING, ZWITTERIONIC GLYCOSPHINGOLIPIDS OF ADULT ONCHOCERCA VOLVULUS ALS HIGHLY CONSERVED ANTIGENIC STRUCTURES OF PARASITIC NEMATODES. BIOCHEM J., 2000. **348**(2): P. 417-423.
68. LOCHNIT, G., ET AL., FIRST IDENTIFICATION OF A PHOSPHORYLCHOLINE-SUBSTITUTED PROTEIN FROM CAENORHABDITIS ELEGANS. ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF THE ASPARTYL PROTEASE ASP-6. BIOLOGICAL CHEMISTRY HOPPE-SEYLER, 2006. **387**: P. 1487-1493.
69. LOCHNIT, G., ET AL., STRUCTURAL ELUCIDATION AND MONOKINE-INDUCING ACTIVITY OF TWO BIOLOGICALLY ACTIVE ZWITTERIONIC GLYCOSPHINGOLIPIDS DERIVED FROM THE PORCINE PARASITIC NEMATODE ASCARIS SUUM. J. BIOL. CHEM., 1998. **278**: P. 466-474.
70. WUHRER, M., ET AL., PHOSPHOCHOLINE-CONTAINING, ZWITTERIONIC GLYCOSPHINGOLIPIDS OF ADULT ONCHOCERCA VOLVULUS AS HIGHLY CONSERVED, ANTIGENIC STRUCTURES OF PARASITIC NEMATODES. BIOCHEM. J., 2000. **348**: P. 417-423.
71. DEEHAN M R, G.H.S., BLAIR B, LOCHNIT G, DENNIS R D, GEYER R, HARNETT M, HARNETT W, *IMMUNOMODULATORY PROPERTIES OF ASCARIS SUUM GLYKOSPHINGOLIPIDS- PHOSPHORYLCHOLINE AND NON-DEPENTENT EFFECTS*. PARASITE IMMUNOL, 2003. **25**.
72. DELL, A., ET AL., IMMUNOGENIC GLYCOCONJUGATES IMPLICATED IN PARASITIC NEMATODE DISEASES. GLYCOBIOLOGY, 1999.
73. HARNETT, W., I.B. MCINNES, AND M.M. HARNETT, *ES-62, A FILARIAL NEMATODE-DERIVED IMMUNOMODULATOR WITH ANTI-INFLAMMATORY POTENTIAL*. IMMUNOL LETT, 2004. **94**(1-2): P. 27-33.
74. HOUSTON, K.M. AND W. HARNETT, *ATTACHMENT OF PHOSPHORYLCHOLINE TO A NEMATODE GLYCOPROTEIN*. TRENDS IN GLYCOSCIENCES AND GLYCOTECHNOLOGY, 1999. **11**: P. 43-52.
75. HOUSTON, K.M. AND W. HARNETT, PREVENTION OF ATTACHMENT OF PHOSPHORYLCHOLINE TO A MAJOR EXCRETORY-SECRETORY PRODUCT OF ACANTHOCEILONEMA VITEAE USING TUNICAMYCIN. J. PARASITOL., 1996. **82**: P. 320-324.

76. HOUSTON, K.M., W. CUSHLEY, AND W. HARNETT, STUDIES ON THE SITE AND MECHANISM OF ATTACHMENT OF PHOSPHORYLCHOLINE TO A FILARIAL NEMATODE SECRETED GLYCOPROTEIN. J. BIOL. CHEM., 1997. **272**: P. 1527-1533.
77. ELBEIN, A.D., GLYCOSIDASE INHIBITORS: INHIBITORS OF N-LINKED OLIGOSACCHARIDE PROCESSING. FASEB J., 1991. **5**: P. 3055-3063.
78. YUSUF, H.K.M., G. POHLENTZ, AND K. SANDHOFF, TUNICAMYCIN INHIBITS GANGLIOSIDE BIOSYNTHESIS IN RAT LIVER GOLGI APPARATUS BY BLOCKING SUGAR NUCLEOTIDE TRANSPORT ACROSS THE MEMBRANE VESICLES. PROC. NATL. ACAD. SCI. USA, 1983. **80**: P. 7075-7079.
79. NOR, Z.M., E. DEVANEY, AND W. HARNETT, THE USE OF INHIBITORS OF N-LINKED GLYCOSYLATION AND OLIGOSACCHARIDE PROCESSING TO PRODUCE MONOCLONAL ANTIBODIES AGAINST NON-PHOSPHORYLCHOLINE EPITOPES OF BRUGIA PAHANGI EXCRETORY-SECRETORY PRODUCTS. PARASITOL RES, 1997. **83**(8): P. 813-5.
80. HOUSTON, K.M. AND W. HARNETT, MECHANISMS UNDERLYING THE TRANSFER OF PHOSPHORYLCHOLINE TO FILARIAL NEMATODE GLYCOPROTEINS - A POSSIBLE ROLE FOR CHOLINE KINASE. PARASITOLOGY, 1999. **118**: P. 311-318.
81. CIPOLLO J F, A.A., COSTELLO C E, ROBBINS P W, HIRSCHBERG C B, *BIOSYNTHESIS IN VITRO CAENORHABDITIS ELEGANS PHOSPHORYLCHOLINE OLIGOSACCHARIDES*. PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES OF AMERICA, 2004. **101**: P. 3404-3408.
82. LOCHNIT, G., IMMUNOMODULATION BY NEMATODES: STRUCTURES, BIOSYNTHESIS AND BIOLOGICAL IMPLICATIONS OF PHOSPHORYLCHOLINE SUBSTITUTED ANTIGENS. HABILITATIONSSCHRIFT, 2003: P. 9.
83. DEA-AYUELA, M.A. AND F. BOLAS-FERNANDEZ, *TRICHINELLA ANTIGENS: A REVIEW*. VET RES, 1999. **30**(6): P. 559-71.
84. DEEHAN, M.R., ET AL., A PHOSPHORYLCHOLINE-CONTAINING FILARIAL NEMATODE-SECRETED PRODUCT DISRUPTS B LYMPHOCYTE ACTIVATION BY TARGETING KEY PROLIFERATIVE SIGNALING PATHWAYS. J. IMMUNOL., 1998. **160**: P. 2692-2699.
85. COUPER, K.N., ET AL., ES-62 IS UNABLE TO MODULATE TOXOPLASMA GONDII-DRIVEN TH1 RESPONSES AND PATHOLOGY. PARASITE IMMUNOL, 2005. **27**(4): P. 147-50.
86. DEEHAN, M.R., W. HARNETT, AND M.M. HARNETT, A FILARIAL NEMATODE-SECRETED PHOSPHORYLCHOLINE-CONTAINING GLYCOPROTEIN UNCOUPLES THE B CELL ANTIGEN RECEPTOR FROM EXTRACELLULAR SIGNAL-REGULATED KINASE-MITOGEN-ACTIVATED PROTEIN KINASE BY PROMOTING THE SURFACE IG-MEDIATED RECRUITMENT OF SRC HOMOLOG 2 DOMAIN-CONTAINING TYROSINE PHOSPHATASE-1 AND PAC-1 MITOGEN-ACTIVATED KINASE-PHOSPHATASE. J IMMUNOL, 2001. **166**(12): P. 7462-8.
87. HARNETT, M.M., KEAN, D.E., ET ALL., THE PHOSPHORYLCHOLINE MOIETY OF THE FILARIAL NEMATODE IMMUNOMODULATOR ES-62 IS RESPONSIBLE FOR ITS ANTI-INFLAMMATORY ACTION IN ARTHRITIS. ANN RHEUM DIS, 2008. **67**(4): P. 518-523.

- 88.DUNNE, D.W. AND A. COOKE, A WORM'S EYE VIEW OF THE IMMUNE SYSTEM: CONSEQUENCES FOR EVOLUTION OF HUMAN AUTOIMMUNE DISEASE. NAT REV IMMUNOL, 2005. **5**(5): P. 420-6.
- 89.HARNETT, W., HARNETT, M.M., IMMUNOMODULATORY ACTIVITY AND THERAPEUTIC POTENTIAL OF THE FILARIAL NEMATODE SECRETED PRODUCT, ES-62. ADV EXP MED BIOL, 2009. **666**: P. 88-94.
- 90.GBEWONYO, K., ET AL., LARGE SCALE CULTIVATION OF THE FREE LIVING NEMATODE CAENORHABDITIS ELEGANS. BIOTECHNOLOGY, 1994. **12**: P. 51-54.
- 91.LAEMMLI, U.K., CLEAVAGE OF STRUCTURAL PROTEINS DURING THE ASSEMBLY OF THE HEAD OF BACTERIOPHAGE T4. NATURE, 1970. **227**: P. 680-685.
- 92.GÖRG, A., ET AL., THE CURRENT STATE OF TWO-DIMENSIONAL ELECTROPHORESIS WITH IMMOBILIZED PH GRADIENTS. ELECTROPHORESIS, 2000. **21**(6): P. 1037-53.
- 93.RABILLOUD T, V.C., LAWRENCE J J, SAMPLE APPLICATION BY IN-GEL REHYDRATION IMPROVES THE RESOLUTION OF TWO-DIMENSIONAL ELECTROPHORESIS WITH IMMOBILIZED PH GRADIENTS IN THE FIRST DIMENSION. ELECTROPHORESIS, 1994. **15**: P. 1552-1558.
- 94.WESTERMEIER, R., *ELECTROPHORESIS IN PRACTICE*. 1990, WEINHEIM, GERMANY: VCH VERLAGSGESELLSCHAFT MBH.
- 95.GÖRG, A., BOGUTH, G., OBERMAIER, C., WEISS, W., , *ELECTROPHORESIS*. ELECTROPHORESIS, 1998. **19**: P. 1516-1519.
- 96.GECKELER, K., ECKSTEIN, H., *BIOANALYTISCHE UND BIOCHEMISCHE LABORMETHODEN*. LEHRBUCH BIOCHEMIE/ ANALYTISCHE CHEMIE, 2000: P. 40.
- 97.KARAS M, H.F., ANAL. CHEM., 1988: P. 2299-3201.
- 98.WWW.ZOOLOGIE-SKRIPT.DE/METHODEN/PROGEN/MALDI/JPG.
- 99.KUSSMANN, M., ET AL., MATRIX-ASSISTED LASER DESORPTION/IONIZATION MASS SPECTROMETRIC PEPTIDE MAPPING OF THE NEURAL CELL ADHESION PROTEIN NEUROLIN PURIFIED BY SODIUM DODECYL SULFATE POLYACRYLAMIDE GEL ELECTROPHORESIS OR ACIDIC PRECIPITATION. J MASS SPECTROM, 1997. **32**(5): P. 483-93.
- 100.KARAS M, G.M., SCHÄFER J, , MASS SPECTROM., 2000. **35**: P. 1-12.
- 101.KNOCHENMUSS A, S.A., BREUKER K, ZENOBI R, J. MASS SPECTROM., 2000. **35**: P. 1237-1245.
- 102.WWW.OC.UNI-KÖLN.DE/MS-OC/ESI-TC.GIF.
- 103.SHEVCHENKO, A., ET ALL., IN GEL DIGESTION FOR MASS SPECTROMETRIC CHARACTERIZATION OF PROTEINS AND PROTEOMS. NAT PROTOC, 2006. **1**: P. 2856-2860.
104. GRAUMANN, J., ET ALL., STABLE ISOTOPE LABELLING BY AMINO ACIDS IN CELL CULTURE (SILAC) AND PROTEOME QUANTITATION OF MOUSE EMBRYONIC STEM CELLS TO A DEPTH OF 5, 111 PROTEINS. MOL CELL PROTEOMICS, 2008. **7**: P. 672-683.
- 105.VOLANAKIS, J.E., CLEMENTS W.L., SCHROHENLOHER, R.E, *C-REACTIVE PROTEIN: PURIFICATION BY AFFINITY CHROMATOGRAPHY AND PHYSICOCHEMICAL CHARACTERIZATION*. IMMUNOL. METHODS, 1978. **23**: P. 285-295.

106. PIERCE, F., *PIERCE BIOTECHNOLOGY. INC.*, 2004. **8**.
107. VOLANAKIS, J.E., HUMAN C-REACTIVE PROTEIN: EXPRESSION, STRUCTURE, AND FUNCTION. *MOL IMMUNOL*, 2001. **38**(2-3): P. 189-97.
108. GABAY C, K.I., ACUTE-PHASE PROTEINS AND OTHER SYSTEMIC RESPONSES TO INFLAMMATION. *N ENGL J MED*, 1999. **340**: P. 448-454.
109. CARLSOHN, COXSACKIEVIRUS B3-INDUZIERTE VERÄNDERUNG DES PROTEOMS DER WIRTSZELLE: UNTERSUCHUNGEN AM ZELLKULTURMODELL MIT HILFE DER ZWEIDIMENSIONALEN GELELEKTROPHORESE. 2004.
110. RABILLOUD, T., ADESSI C, GIRAUDÉL A, LUNARDI J, IMPROVEMENT OF THE SOLUBILIZATION OF PROTEINS IN TWO-DIMENSIONAL ELECTROPHORESIS WITH IMMOBILIZED PH GRADIENTS. *ELECTROPHORESIS MAR-APR*, 1997. **18**(3-4): P. 307-16.
111. KUSHNER I, S.J., *BIOCHEM BIOPHYS. ACTA*, 1970. **207**: P. 105.
112. RILEY R F, C.M.K., HOKAMA Y, *CLIN. CHEM. ACTA*, 1965. **11**: P. 530.
113. MCLEOD, C.M., A.O.T., *J.EXP.MED.*, 1941. **73**: P. 183.
114. GOTSCHLICH E C, E.G.M., *PROC NATL ACAD SCI U S A*, 1965. **54**: P. 558.
115. OSMAND, A.P., R.F.MORTENSEN, J.SIEGEL AND H.GEWURZ, *J.EXP.MED*, 1975. **142**: P. 1065.
116. PORATH J, E.A., METAL CHELATE AFFINITY CHROMATOGRAPHY, A NEW APPROACH TO PROTEIN FRACTIONATION. *NATURE*, 1975. **258**(5536): P. 598-599.
117. PAGE, A.P., G. MCCORMACK, AND A.J. BIRNIE, BIOSYNTHESIS AND ENZYMOLOGY OF THE CAENORHABDITIS ELEGANS CUTICLE: IDENTIFICATION AND CHARACTERIZATION OF A NOVEL SERINE PROTEASE INHIBITOR. *INT J PARASITOL*, 2006. **36**(6): P. 681-9.
118. WESSEL, D. AND U.I. FLUGGE, A METHOD FOR THE QUANTITATIVE RECOVERY OF PROTEIN IN DILUTE SOLUTION IN THE PRESENCE OF DETERGENTS AND LIPIDS. *ANAL BIOCHEM*, 1984. **138**(1): P. 141-3.
119. KAY R, B.C., ET AL, ENRICHMENT OF LOW MOLECULAR WEIGHT SERUM PROTEINS USING ACETONITRILE PRECIPITATION FOR MASS SPECTROMETRY BASED PROTEOMIC ANALYSIS. *RAPID COMMUN MASS SPECTROM*, 2008. **22**(20): P. 3255-3260.
120. WESSEL D, F.U., A METHOD FOR THE QUANTITATIVE RECOVERY OF PROTEIN IN DILUTE SOLUTION IN THE PRESENCE OF DETERGENTS AND LIPIDS. *ANAL BIOCHEM*, 1984. **138**: P. 141-143.
121. O'FARRELL, P.H., *HIGH RESOLUTION TWO-DIMENSIONAL ELECTROPHORESIS OF PROTEINS*. *J. BIOL. CHEM.*, 1975. **250**: P. 4007-4021.
122. CORBETT J, D.M., POSCH A, GÖRG A, POSITIONAL REPRODUCIBILITY OF PROTEIN SPOTS IN TWO-DIMENSIONAL POLYACRYLAMIDE GEL ELECTROPHORESIS USING IMMOBILIZED PH GRADIENT ISO-ELECTRIC FOCUSING IN THE FIRST DIMENSION: AN INTERLABORATORY COMPARISON. *ELECTROPHORESIS*, 1994. **15**: P. 1205-1211.
123. BLOMBERG A, B.L., FEY SJ, LARSEN PM, ROEPSTORFF P, DEGAND P, BOUTRY M, POSCH A, GÖRG INTERLABORATORY REPRODUCIBILITY OF YEAST PROTEIN PATTERNS ANALYZED BY

IMMOBILIZED PH GRADIENT TWO-DIMENSIONAL GEL ELECTROPHORESIS. ELECTROPHORESIS, 1995. **16**: P. 1935-1945.

124. BJELLQVIST, B., EK K., RIGHETTI PG, GIANAZZA E, GORG A, WESTERMAIER R, POSTEL W, *ISOELECTRIC FOCUSING IN IMMOBILIZED PH GRADIENTS: PRINCIPLE, METHODOLOGY AND SOME APPLICATIONS*. J BIOCHEM BIOPHYS METHODS SEP, 1982. **6**(4): P. 317-39.

125. ALTLAND, K., *ELECTROPHORESIS*. ELECTROPHORESIS, 1990. **11**: P. 140-147.

126. POSCH, A., BRUBACHER, M.G., COHEN, A., EXPRESSION PROTEOMICS: TROUBLESHOOTING FÜR DIE ZWEIDIMENSIONALE GELEKTROPHORESE. BIOSPEKTRUM, 2005. **6**: P. 785-787.

127. GÖRG, A., W. WEISS, AND M.J. DUNN, *CURRENT TWO-DIMENSIONAL ELECTROPHORESIS TECHNOLOGY FOR PROTEOMICS*. PROTEOMICS, 2004. **4**(12): P. 3665-85.

128. HERBERT, B.R., ET AL., IMPROVED PROTEIN SOLUBILITY IN TWO-DIMENSIONAL ELECTROPHORESIS USING TRIBUTYL PHOSPHINE AS REDUCING AGENT [IN PROCESS CITATION]. ELECTROPHORESIS, 1998. **19**(5): P. 845-51.

129. EICHACKER, L.A., GRANVOGEL, B., MIRUS, O., ET AL., *HIDING BEHIND HYDROPHOBICITY*. THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, 2004. **279**: P. 50915-50922.

130. VAN MONTFORT, B.A., DOEVEN, M.K., CANAS, B., ET AL., COMBINED IN -GEL TRYPTIC DIGESTION AND CNBR CLEAVAGE FOR THE GENERATION OF PEPTIDE MAPS OF AN INTEGRAL MEMBRAN PROTEIN WITH MALDI-TOF MASS SPECTROMETRY. BIOCHIMICA ET BIOPHYSICA ACTA, 2002. **1555**: P. 111-115.

131. NEMOTO-SASAKI Y, H.K., HIROYUKI O, ARATA Y, KANEKO MK, SAITOU N, HIRABAYASHI J, KASAI K, *CAENORHABDITIS ELEGANS GALECTINS LEC-1–LEC-11: STRUCTURAL FEATURES AND SUGAR-BINDING PROPERTIES* BIOCHIMICA ET BIOPHYSICA ACTA, 2008. **1780**(10): P. 1131-1142.

132. ARATA Y, I.N., TAMURA M, NONAKA T, KASAI K, IDENTIFICATION OF THE AMINO ACID RESIDUE IN THE NEMATODE GALECTIN LEC-1 RESPONSIBLE FOR ITS UNIQUE SUGAR BINDING PROPERTY : ANALYSIS BY COMBINATION OF SITE-DIRECTED MUTAGENESIS AND FRONTAL AFFINITY CHROMATOGRAPHY. BIOLOGICAL AND PHARMACEUTICAL BULLETIN, 2007. **30**(11): P. 2012-2017.

133. GERDT, S., ET AL., ISOLATION, CHARACTERIZATION AND IMMUNOLOCALIZATION OF PHOSPHOCHOLINE-SUBSTITUTED GLYCOLIPIDS IN DEVELOPMENTAL STAGES OF CAENORHABDITIS ELEGANS. EUR. J. BIOCHEM., 1999. **266**: P. 952-963.

134. APOLONIA NOVILLO, A., WON S-J., LI, C., CALLARD, I.P., CHANGES IN NUCLEAR RECEPTOR AND VITELLOGENIN GENE EXPRESSION IN RESPONSE TO STEROIDS AND HEAVY METAL IN CAENORHABDITIS ELEGANS. INTEGRATIVE AND COMPARATIVE BIOLOGY, 2005. **45**(1): P. 61-71.

**Der Lebenslauf wurde aus der elektronischen
Version der Arbeit entfernt.**

**The curriculum vitae was removed from the
electronic version of the paper.**

DANKSAGUNG

Vielen, vielen Dank möchte ich nun den tollen Menschen sagen, die mich während der Phase der Doktorarbeit unterstützt haben und nur mit deren Hilfe diese Arbeit entstehen konnte:

Ich möchte mich ganz herzlich bei meinem Doktorvater PD Dr. Günter Lochnit für seine Zuverlässigkeit, seinen Zuspruch und seine kompetenten Ratschläge bedanken. Ich konnte mich jederzeit an ihn wenden und habe mich während der gesamten Phase der Doktorarbeit sehr gut betreut gefühlt.

Ganz herzlich danke ich Dr. Julia Grabitzki für ihre tolle Unterstützung und ihre Kompetenz während der experimentellen Phase meiner Doktorarbeit.

Vielen Dank an Dr. Markus Krüger für die ESI-MS-Analyse im Max-Planck-Institut in Bad Nauheim und für die hilfreichen Tipps.

Ein großes Dankeschön gilt Michael Dreisbach und Christina Schmidt für ihre unermüdlichen und kompetenten Ratschläge, ihre Hilfsbereitschaft und ihre Sorgfalt.

Hans-Günter Welker und Peter Dotzauer danke ich für die emotionale Unterstützung und für die witzigen Anekdoten, welche die Laborarbeit oft viel angenehmer gemacht haben.

Bei Erkan und Vincent bedanke ich mich für all die witzigen verrückten Momente im Labor und für den Teamgeist.

Meinen Eltern und meinen Geschwistern danke ich fürs Zuhören, Mutmachen und dafür, dass sie sich so sicher waren, dass ich es schaffe.

Meiner lieben Oma, die sich ständig nach meiner Doktorarbeit informiert und mich dadurch angespornt hat, möchte ich ganz herzlich Danke sagen.

Vielen Dank an Dani, Gabi, Katha, Elisa, Bibi und Sonja dafür, dass sie an mich glauben.

Oli danke ich für das A&O!

Vielen Dank!!